

Untersuchungen zur affinitäts-basierten Aufreinigung von *tight junction*-Proteinen und deren potentiellen Interaktionspartnern

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl.-Ing. agr. Dörte Lohrberg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Wolfgang Lockau
2. PD Dr. Ingolf E. Blasig
3. Prof. Dr. Ottmar Huber

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 2009

meiner Familie

Auszug

Die Epithelien vielzelliger Organismen bilden eine funktionelle Grenzschicht, die für die Homöostase innerhalb und für den spezifischen Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten verantwortlich ist. Der interzelluläre Spalt zwischen Epithelzellen wird durch *tight junctions* verschlossen, die eine selektive Permeabilitätsbarriere bilden. Da viele Krankheiten auf eine Dysfunktion der Barriere zurückzuführen sind, ist eine genaue Kenntnis der molekularen Zusammensetzung der *tight junctions* aus pharmakologischer Sicht von großem Interesse. In dieser Arbeit wurden Anreicherungsstrategien entwickelt, die eine Proteomanalyse der *tight junction*-Proteine erlauben. Der Fokus wurde dabei auf die Claudine und Tricellulin gelegt, die als transmembranale Proteine das molekulare Rückgrat der *tight junctions* bilden. Durch Affinitätsreinigung gelang erstmals eine Anreicherung verschiedener Claudine, die durch Massenspektrometrie identifiziert wurden. Die metabolische Markierung der Proteine mit stabilen Isotopen (SILAC) erlaubte die quantitative Diskriminierung von Proteinen, die unspezifisch an das Matrixmaterial banden. Von den potentiellen Interaktionspartnern der Claudine wurden Integrin- α_3 , SUMO-1 und Sphingosinkinase 2 ausgewählt, um deren Interaktion mit Claudinen weiter zu verifizieren. Es wurden keine Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Claudinen und Integrin- α_3 sowie SUMO-1 gefunden, während die Interaktion von Claudinen mit Sphingosinkinase 2 weder bestätigt noch ausgeschlossen werden konnte. Ferner wurde eine Affinitätsreinigung durchgeführt, um Interaktionspartner von Tricellulin anzureichern. Durch die quantitative massenspektrometrische Analyse wurde ausschließlich Claudin-4 nicht aber Claudin-3 und -7 als potentieller, spezifischer Interaktionspartner von Tricellulin identifiziert. Es wurde aber gezeigt, dass die Kombination aus Affinitätsreinigung und quantitativer Massenspektrometrie einen wertvollen Beitrag zur Entschlüsselung von Protein-Komplexen leisten kann.

Schlagworte: tight junctions, Proteom, Affinitätsreinigung, SILAC

Abstract

Epithelia function as specialized barriers that separate different compartments within multicellular organisms and regulate the specific exchange of substances between them. The intercellular space between adjacent epithelial cells is sealed by tight junctions forming a permeability barrier. Dysregulation of the barrier occurs in a variety of diseases. Hence, a deeper knowledge is required of the molecular composition of tight junctions, in particular with respect to pharmacological applications. In the present study, new enrichment strategies have been established that allow the proteomic analysis of tight junction proteins. Special emphasis was placed on claudins and tricellulin as these transmembrane proteins constitute the molecular backbone of the tight junctions. For the first time, using an affinity purification, the enrichment of several claudins was accomplished that were identified by mass spectrometry. The metabolic labeling of proteins with stable isotopes (SILAC) allowed the quantitative discrimination of proteins that bound unspecifically to the matrix. Integrin- α_3 , SUMO-1 and sphingosin kinase 2 were chosen for further verifications from the proteins considered to potentially interact with claudins. While there was no evidence for an association of claudins with integrin- α_3 and SUMO-1, an interaction of claudins with sphingosin kinase 2 could be neither confirmed nor disproved. Furthermore, an affinity purification was performed in order to enrich interaction partners of tricellulin. Claudin-4 was identified as a specific, potential interaction partner of tricellulin by quantitative mass spectrometric analysis whereas claudin-3 and -7 were determined to be enriched unspecifically. The present study demonstrates that a combination of affinity purification and quantitative mass spectrometry can substantially contribute to the elucidation of protein complexes.

Keywords: tight junctions, proteome, affinity purification, SILAC

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Tight Junctions</i>	1
1.2 Proteine des <i>tight junction</i> -Komplexes	3
1.2.1 Transmembranproteine des <i>tight junction</i> -Komplexes	4
1.2.2 Gerüst- und Adapterproteine des <i>tight junction</i> -Komplexes	6
1.2.3 Regulatorische Proteine des <i>tight junction</i> -Komplexes	8
1.3 Interaktionen von Claudinen.....	9
1.3.1 Claudin-Claudin-Interaktionen	9
1.3.2 Interaktionspartner der Claudine	10
1.3.3 Claudine sind Rezeptoren des <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxins	12
1.4 Proteomanalysen.....	14
1.4.1 Methoden der Proteomanalyse	15
1.4.2 Anreicherung von Proteinen in Subproteomen	16
1.4.3 Proteomische Charakterisierung von Protein-Komplexen.....	17
1.4.4 Proteomische Analysen des <i>tight junction</i> -Komplexes	19
1.5 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial	23
2.1.3 Chemikalien.....	24
2.1.4 Medien und Puffer für die Zellkultur	26
2.1.5 Kits	27
2.1.6 Antikörper	27
2.1.7 Plasmide.....	28
2.1.8 Bakterienstämme	28
2.1.9 Zelllinien	28
2.2 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1 GST-Konstrukt mit <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin (CPE).....	29
2.2.2 Transformation von Bakterien	29
2.2.3 Lagerung von <i>E. coli</i> -Bakterien in Glycerin	30

2.3	Proteinchemische Methoden	30
2.3.1	Expression und Reinigung der GST-Proteine	30
2.3.2	Dialyse	31
2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	31
2.3.4	Acetonfällung.....	31
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.3.5.1	Probenvorbereitung	32
2.3.5.2	Mini Protean® II.....	32
2.3.5.3	Xcell Sure Lock™	33
2.3.5.4	Protean II xi 2-D Gel.....	33
2.3.6	Fixierung und Färbung der Polyacrylamidgele	34
2.3.6.1	Coomassie-Färbung 1	34
2.3.6.2	Coomassie-Färbung 2	34
2.3.6.3	Silberfärbung.....	34
2.3.7	Western Blot	35
2.3.8	Größenausschluss-Chromatographie	36
2.3.9	GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung für die Anreicherung von Claudinen und deren Interaktionspartnern	37
2.3.9.1	Affinitätsreinigung mit dem <i>E. coli</i> -Rohextrakt der GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ - Expression	37
2.3.9.2	Affinitätsreinigung mit dem gereinigten GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉	37
2.3.9.3	Affinitätsreinigung nach Zellinkubation mit GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉	39
2.3.10	GST-Tricellulin ₃₇₅₋₅₅₉ -Affinitätsreinigung für die Anreicherung von Interaktionspartnern von Tricellulin	39
2.3.11	Immunpräzipitation	40
2.4	Zellbiologische Methoden.....	41
2.4.1	Kultivierung von Caco-2-Zellen	41
2.4.2	Kultivierung von NRC-Zellen	41
2.4.3	Kultivierung von hCMEC/D3-Zellen.....	42
2.4.4	Kultivierung von HT29B/6-Zellen.....	43
2.4.5	Isotopische Markierung für SILAC-Experimente	43
2.4.6	Zellzahlbestimmung	43
2.4.7	Kryokonservierung von Zellen	44
2.4.8	Herstellung von eukaryotischen Zelllysaten	44
2.4.9	Immunfluoreszenzfärbungen	45
2.5	Proteinanalytische Methoden	46
2.5.1	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	46
2.5.2	Massenspektrometrische Analyse LC-ESI-MS/MS	47
2.5.3	SILAC-Quantifizierung von Proteinen	48
2.5.4	Bestimmung der Markierungseffizienz	49

3	Ergebnisse	50
3.1	Optimierung der Parameter der GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ - Affinitätsreinigung	50
3.1.1	<i>Normal rat cholangiocyte</i> -Zellen als Modellsystem für die Untersuchung von <i>tight junctions</i>	50
3.1.2	Solubilisierung von Claudinen durch Triton X-100	52
3.1.3	Durchführung der Affinitätsreinigung mit dem gereinigten GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Fusionsprotein zur Anreicherung von Claudinen aus einem eukaryotischen Zelllysät	53
3.1.4	Verbesserung des Reinheitsgrades des GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ - Fusionsproteins durch erhöhte DTT- und Salzkonzentrationen	57
3.1.5	1% Triton X-100 im Waschpuffer und ein Wechsel des Reaktionsgefäßes vor der Elution reduzieren unspezifisch-bindende Proteine aus dem Zelllysät	58
3.2	Spezifische Anreicherung von Proteinen durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung	59
3.2.1	Claudin-1, -3, -4, -5 und -7 wurden durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ - Affinitätsreinigung spezifisch angereichert	59
3.2.2	Spezifische Anreicherung von Claudinen durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung in Gehirnkapillarendothelzellen	61
3.2.3	Anreicherung von weiteren <i>tight junction</i> -Proteinen durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung	63
3.3	Proteomanalyse der durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung gebundenen Proteine	64
3.3.1	In Gegenwart von isotope markierten Aminosäuren kultivierte NRC-Zellen zeigen keine morphologischen Unterschiede	65
3.3.2	Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen (SILAC) erlaubt die quantitative Unterscheidung von spezifisch und unspezifisch bindenden Proteinen	66
3.3.3	Bestätigung der spezifische Anreicherung von Claudinen durch massenspektrometrische Analysen	69
3.3.4	Massenspektrometrische Identifizierung bekannter <i>tight junction</i> -Proteine	70
3.3.5	Quantifizierungen reproduzierbar gebundener Proteine	71
3.4	Verifizierung der Interaktion mittels CPE angereicherter Proteine mit Claudinen	79
3.4.1	Charakterisierung der Anreicherung von SUMO-1	79
3.4.2	Charakterisierung der Anreicherung von Integrin- α_3	81
3.4.3	Charakterisierung der Anreicherung von Sphingosinkinase 2	82
3.5	Proteomanalyse der durch die GST-Tricellulin ₃₇₅₋₅₅₉ - Affinitätsreinigung gebundenen Proteine	85
4	Diskussion	88
4.1	Entwicklung der GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung	88
4.1.1	Ko-Affinitätsreinigung durch ein GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Fusionsprotein	88
4.1.2	Solubilisierung von Claudinen	89
4.1.3	Reduzierung von unspezifischen Bindungen	90
4.2	Quantitative Massenspektrometrie erlaubt die Diskriminierung unspezifisch bindender Proteine	91

4.3	Anreicherung von Claudinen durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung	92
4.4	Potentielle physiologische Relevanz der spezifisch angereicherten Proteine	94
4.4.1	Kernproteine	94
4.4.2	Proteine der Mitochondrien und Ribosomen	95
4.4.3	Membranproteine	95
4.4.4	Proteine des Zytoskeletts	97
4.4.5	Proteine des Zytoplasmas	98
4.5	Tricellulin ₃₇₅₋₅₅₉ -Affinitätsreinigung	101
4.6	Proteomanalysen mit Affinitätsreinigungen	102
4.7	Proteomanalysen von <i>tight junctions</i>	104
4.8	Schlussfolgerungen und Ausblick	106
5	Zusammenfassung	108
6	Summary	109
7	Literatur	110
8	Anhang	127
8.1	Durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung A gebundene Proteine	127
8.2	Durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung B gebundene Proteine	135
8.3	Durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung C gebundene Proteine	154
	Erklärung	161
	Danksagung	162

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zell-Zell-Verbindungen in Epithelzellen.....	2
Abbildung 2: Proteine des <i>tight junction</i> -Komplexes (Guillemot et al. 2008).	3
Abbildung 3: Lokalisierung von Tricellulin (Ikenouchi et al. 2005)	5
Abbildung 4: Funktionelle Motive der Claudine (Chiba et al. 2008).	11
Abbildung 5: Alternative Methoden für die Markierung von Peptiden mit stabilen Isotopen.	19
Abbildung 6: Extrahierte Ionen-Chromatogramme (XIC) eines isotopenmarkierten [¹³ C]- und des entsprechenden unmarkierten [¹² C]-Peptides.	49
Abbildung 7: Charakterisierung von Caco-2- und NRC-Zellen hinsichtlich der Expression von Claudinen.	51
Abbildung 8: Vergleich verschiedener Lysepuffer hinsichtlich der Solubilisierung von Claudinen.	52
Abbildung 9: Anreicherung von Claudin-3 und Mitanreicherung von Claudin-1 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung mit dem <i>E. coli</i> -Rohextrakt.	54
Abbildung 10: Vergleich des Bindungsvermögens des GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ im <i>E. coli</i> -Rohextrakt und des gereinigten GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ an Claudin-3.	55
Abbildung 11: Anreicherung von Claudin-3 und Mitanreicherung von Claudin-1 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung mit dem gereinigten GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉	55
Abbildung 12: Anreicherung von Claudin-3 und Mitanreicherung von Claudin-1 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung nach Inkubation der Zellen mit GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ vor der Zellyse.	56
Abbildung 13: Reduzierung der unspezifischen Bindungen bei der Reinigung des GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Fusionsproteins.	58
Abbildung 14: Reduzierung der unspezifischen Bindungen bei der Durchführung der GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung.	59
Abbildung 15: Nachweis der spezifischen Anreicherung von Claudin-3, -4 und -7 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung in NRC-Zellen.	60
Abbildung 16: Nachweis der spezifischen Anreicherung von Claudin-1 und -5 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung in NRC-Zellen.	61
Abbildung 17: Nachweis der spezifischen Anreicherung von Claudin-1 und -5 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung unter Verwendung von hCMEC/D3-Zellen.	62
Abbildung 18: Anreicherung von ZO-1 und JAM-A durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung.....	63

Abbildung 19: Proteomanalyse der durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung gebundenen Proteine.....	64
Abbildung 20: Vergleich von in Gegenwart verschiedener Aminosäuren kultivierter NRC-Zellen.	65
Abbildung 21: Isotopenmuster eines Peptids der ATP synthase subunit beta (a) und von Claudin-3 (b).	67
Abbildung 22: Verteilung der ¹³ C/ ¹² C-Quantifizierungswerte der drei Affinitätsreinigungen.....	68
Abbildung 23: Anzahl von den durch die drei Affinitätsreinigungen gebundenen Proteinen.....	71
Abbildung 24: Einteilung der reproduzierbar spezifisch angereicherten Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation.....	72
Abbildung 25: Nachweis der Anreicherung von SUMO-1 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung.....	80
Abbildung 26: Analyse der Ko-Lokalisation eines potentiell sumoylierten Proteins mit Claudin-4 anhand von Immunfluoreszenzfärbungen.	81
Abbildung 27: Nachweis der Anreicherung von Integrin- α_3 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung.....	82
Abbildung 28: Nachweis der spezifischen Anreicherung von Sphingosinkinase 2 durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung.	83
Abbildung 29: Analyse der Ko-Lokalisation von Sphingosinkinase 2 mit Claudin-1 anhand von Immunfluoreszenzfärbungen.....	83
Abbildung 30: Nachweis der Anreicherung von Sphingosinkinase 2 (SphK2) und Claudin-3 durch eine Immunpräzipitation (IP) mit einem Sphingosinkinase 2-Antikörper.	84
Abbildung 31: Expression von Tricellulin in MDCK-, HT29/B6- und NRC-Zellen.....	85
Abbildung 32: Verteilung der ¹³ C/ ¹² C-Quantifizierungswerte der GST-Tricellulin ₃₇₅₋₅₅₉ -Affinitätsreinigung.....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Assoziationskonstanten der Interaktion der verschiedenen Claudine mit CPE...	13
Tabelle 2: Medien für die Transformation von Bakterien.....	29
Tabelle 3: Puffer für die GST-Proteinreinigung.	30
Tabelle 4: Puffer für die SDS-PAGE.	32
Tabelle 5: Auftrennungsbereiche von Polyacrylamidgelen.	32
Tabelle 6: Zusammensetzung der Gellösungen für die SDS-PAGE (Mini Protean®II).....	33
Tabelle 7: Zusammensetzung der Gellösungen für ein 4-18%iges Gradientengel.	33
Tabelle 8: Lösung für die Coomassie-Färbung 1.	34
Tabelle 9: Lösungen für die Coomassie-Färbung 2.	34
Tabelle 10: Lösungen für die Silberfärbung.	35
Tabelle 11: Lösungen für den Western Blot.	36
Tabelle 12: Puffer für die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung.	38
Tabelle 13: Puffer für die Immunpräzipitation.....	40
Tabelle 14: Kulturbestandteile für Caco-2-Zellen.	41
Tabelle 15: Kulturbestandteile für NRC-Zellen.	42
Tabelle 16: Kulturbestandteile für hCMEC/D3-Zellen.	42
Tabelle 17: Kulturbestandteile für HT29/B6-Zellen.	43
Tabelle 18: Lysepuffer für eukaryotische Zellen.....	45
Tabelle 19: Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbungen.	46
Tabelle 20: Lösungen für die massenspektrometrischen Analysen.	47
Tabelle 21: MASCOT-Parameter für die Datenbanksuche in SwissProt.	48
Tabelle 22: Parameter der drei unabhängigen GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigungen A, B und C.	65
Tabelle 23: Massenspektrometrische Identifizierung von Claudinen.	69
Tabelle 24: Massenspektrometrische Identifizierung bekannter <i>tight junction</i> -Proteine.	71
Tabelle 25: Spezifisch durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die im Zellkern lokalisiert sind.....	73
Tabelle 26: Spezifisch durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die in den Mitochondrien lokalisiert sind.....	74
Tabelle 27: Spezifisch durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind.	76
Tabelle 28: Spezifisch durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die im Zytosol lokalisiert sind.....	77
Tabelle 29: Spezifisch durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die zum Zytoskelett gehören.	78
Tabelle 30: Spezifisch durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ -Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die in den Ribosomen lokalisiert sind.	78

Tabelle 31: Spezifisch durch die GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ –Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind.	79
Tabelle 32: Proteine, die spezifisch durch die GST-Tricellulin ₃₇₅₋₅₅₉ –Affinitätsreinigung angereichert wurden.	87

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
AF	Afadin
aPKC	atypische Proteinkinase C
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktoren
AS	Aminosäuren
ASIP	<i>atypical PKC isotype-specific interacting protein</i>
BLU	<i>Boehringer light units</i>
Caco	<i>human carcinoma colon</i>
CAR	<i>coxsackie and adenovirus receptor</i>
Cdc42	<i>cell-division control protein 42</i>
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
CLMP	<i>CAR-like membrane protein</i>
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
CTX	<i>cortical thymocyte marker in Xenopus</i>
DOC	Desoxycholsäure Natriumsalz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ESAM	<i>endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i>
GST	Glutathione S-Transferase
huASH1	<i>human absent, small or homeotic discs 1</i>
ICAT	<i>isotope coded affinity tags</i>
IP	Immunpräzipitation
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
LB	Luria-Bertani
LYRIC	<i>lysine-rich CEACAM1</i>
MAGI	<i>membrane-associated guanylate kinase inverted protein</i>
MAGUK	<i>membrane-associated guanylyl kinase</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>
MAPK	<i>mitogen-activated proteinkinase</i>
MDCK	<i>Madine Darby canine kidney</i>
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MudPIT	multidimensionale Protein Identifikations Technik

MUPP1	<i>multi-PDZ domain protein 1</i>
NMES1	<i>normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein</i>
NRC	<i>normal rat cholangiocyte</i>
OAP-1	<i>OSP/Claudin-11-associated protein 1</i>
OD	optische Dichte
OSP	<i>oligodendrocyte-specific protein</i>
Pals1	<i>protein associated with Lin seven 1</i>
PAR	<i>partitioning-defective protein</i>
PATJ	<i>Pals1-associated tight junction protein</i>
PDZ	<i>postsynaptic protein-95/discs large/zonula occludens</i>
PFO	Perfluorooctansäure
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
PTEN	<i>tumor suppressor phosphatase and tensin homologue</i>
RanBP2	<i>Ran-binding protein 2</i>
RanGAP1	<i>RanGTPase-activating protein 1</i>
ROCK	<i>Rho-associated kinase</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SphK2	Sphingosinkinase 2
SUMO-1	<i>small ubiquitin-related modifier 1</i>
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TJ	<i>tight junction</i>
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TX-100	Triton X-100
VAP	<i>vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein</i>
WB	Western Blot
WNK4	<i>With No K (lysine) 4</i>
ZO	zonula occludens
ZONAB	<i>ZO-1-associated nucleic-acid binding</i>

1 Einleitung

1.1 *Tight Junctions*

Epithelien sind ein- oder mehrlagige Zellschichten, die alle inneren Körperhöhlen und äußeren Körperoberflächen vielzelliger Organismen bedecken. Sie bilden eine funktionelle Grenzschicht, die für die Homöostase innerhalb und für den spezifischen Stoffaustausch zwischen den verschiedenen Kompartimenten verantwortlich ist. Endothelien sind spezialisierte Epithelien, die die Blutgefäße im Gehirn auskleiden. Sie sorgen für die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke, einer physiologischen Barriere, die das unkontrollierte Eindringen von Bestandteilen des Bluts in das Hirngewebe verhindert (Wolburg und Lippoldt, 02).

Epithelien bestehen aus polarisierten Zellen, deren apikale Membran dem Äußeren oder Lumen zugewandt ist und deren basale Membran über die Basallamina mit dem darunterliegenden Gewebe verbunden ist. Im Epithelgewebe sind die Zellen durch besonders starke Zell-Zell-Verbindungen fest miteinander verbunden. Dadurch kommt es zur Ausbildung von Barrieren, die den Transport von Wasser und gelösten Substanzen durch die interzellulären Zwischenräume des Epithels auf dem parazellulären Weg regulieren. Ein hoch spezifischer Transport findet außerdem auf dem transzellulären Weg über Kanäle, Transporter, Pumpen und Vesikel statt (Bazzoni, 06). An der Verknüpfung der Epithelzellen seitens der lateralen Membran sind verschiedene Formen von Zell-Zell-Verbindungen beteiligt (Abbildung 1a). Die *adherens junctions* initialisieren und stabilisieren die Zell-Zell-Adhäsion und sind an der Organisation des Actinzytoskeletts beteiligt. Die Desmosomen sorgen über Intermediärfilamente für die Verbindung der Zytoskelette benachbarter Zellen, und die *gap junctions* spielen bei der interzellulären Kommunikation eine Rolle (Gilligan und Bennett, 93). Eine besonders charakteristische Zell-Zell-Verbindung stellen die *tight junctions* dar, die der apikalen Membran am nächsten gelegen sind. Im Bereich der *tight junctions* liegen die Plasmamembranen benachbarter Zellen direkt aneinander, da Adhäsionsproteine beider Membranen über ihre extrazellulären Domänen miteinander interagieren. Dadurch werden die Membranen fest aneinandergebunden und der interzelluläre Raum verschlossen. Die engen Zell-Zell-Kontakte bilden ein verzweigtes Netz abdichtender Stränge, die die apikalen Enden aller Zellen einer Epithelschicht vollständig umschließen (Abbildung 1 b). Die *tight junctions* bilden eine selektive Permeabilitätsbarriere aus, da sie die freie Diffusion von gelösten Substanzen durch das Epithel auf parazellulärem Weg zwischen den Epithelzellen hindurch verhindern (*gate-function*) (Denker und Nigam, 98).

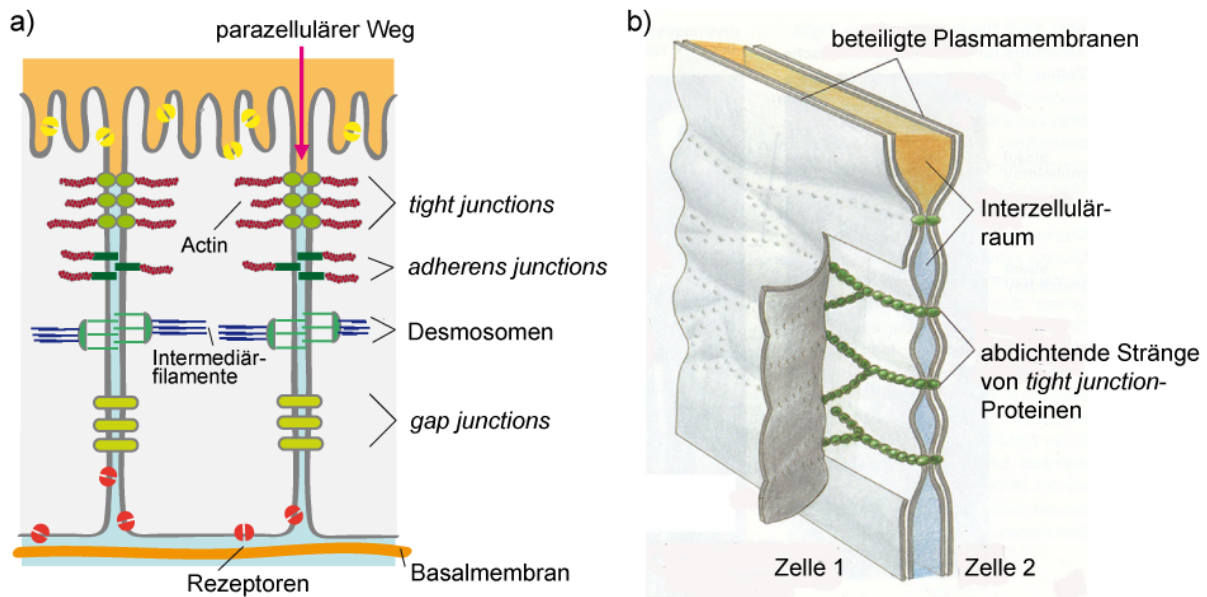


Abbildung 1: Zell-Zell-Verbindungen in Epithelzellen.

a) An der Verbindung der lateralen Plasmamembranen von Epithelzellen sind die vier Zell-Zell-Kontakte *gap junctions*, *Desmosomen*, *adherens junctions* und *tight junctions* beteiligt. Die Verbindung mit dem Zytoskelett erfolgt bei den *gap junctions* und *Desmosomen* über die Intermediärfilamente und bei den *adherens junctions* und *tight junctions* über die Actinfilamente. b) *Tight junctions* bilden besonders enge Zell-Zell-Kontakte, die im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran der Epithelzellen in Strängen organisiert sind und dadurch den parazellulären Spalt verschließen.

Die *tight junctions* verschiedener Epithelien weisen Unterschiede in ihrer Dichtheit auf, da sie sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden. Als Maß für die Dichtheit dient der transepitheliale elektrische Widerstand, der je nach Epithel zwischen 5 und 5000 Ω/cm^2 liegt (Powell, 81). Darüber hinaus sorgen die *tight junctions* für die Polarität der Epithelzellen, indem sie den apikalen vom basolateralen Bereich der Plasmamembran trennen (*fence-function*). Da eine laterale Diffusion von Membranproteinen und Lipiden über die *tight junctions* hinweg nicht stattfinden kann, wird eine unterschiedliche Ausstattung der apikalen bzw. basolateralen Plasmamembran mit Rezeptoren und anderen Membrankomponenten ermöglicht (Fanning et al., 99).

Die Formierung der *tight junctions* an Zell-Zell-Kontakten einschließlich der Ausbildung von Barrieren ist kein statischer Zustand. *Tight junctions* sind vielmehr ein dynamischer Komplex, der sich in einem ständigen Auf- und Abbau befindet. Um die Homöostase der Kompartimente aufrecht zu erhalten, befinden sich Epithelien in einem Gleichgewicht aus Zellproliferation und Apoptose (von Herbay und Rudi, 00). In die dynamischen Prozesse, die mit der Morphogenese von Epithelien einhergehen, sind *tight junctions* direkt involviert (Schock und Perrimon, 02).

1.2 Proteine des *tight junction*-Komplexes

In den *tight junction*-Komplex sind mehr als 40 verschiedene Proteine involviert (Abbildung 2) (Gonzalez-Mariscal et al., 03). Während die transmembranalen Proteine der *tight junctions* die Zelladhäsion vermitteln und die Funktionalität der intramembranen sowie parazellulären Diffusionsbarriere gewährleisten, kommen den an der zytoplasmatischen Seite der *tight junctions* assoziierten Proteinen die unterschiedlichsten Aufgaben zu. Eine Vielzahl von Gerüst- und Adapterproteinen interagieren mit den Transmembranproteinen in großen Komplexen und vermitteln die Signaltransduktionsprozesse, an denen die *tight junctions* beteiligt sind, indem sie zahlreiche regulatorische Proteine wie G-Proteine, Kinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren zu den *tight junctions* rekrutieren. Des Weiteren ermöglichen die Gerüst- und Adapterproteine eine Verbindung der *tight junctions* mit dem Zytoskelett (Kohler und Zahraoui, 05).

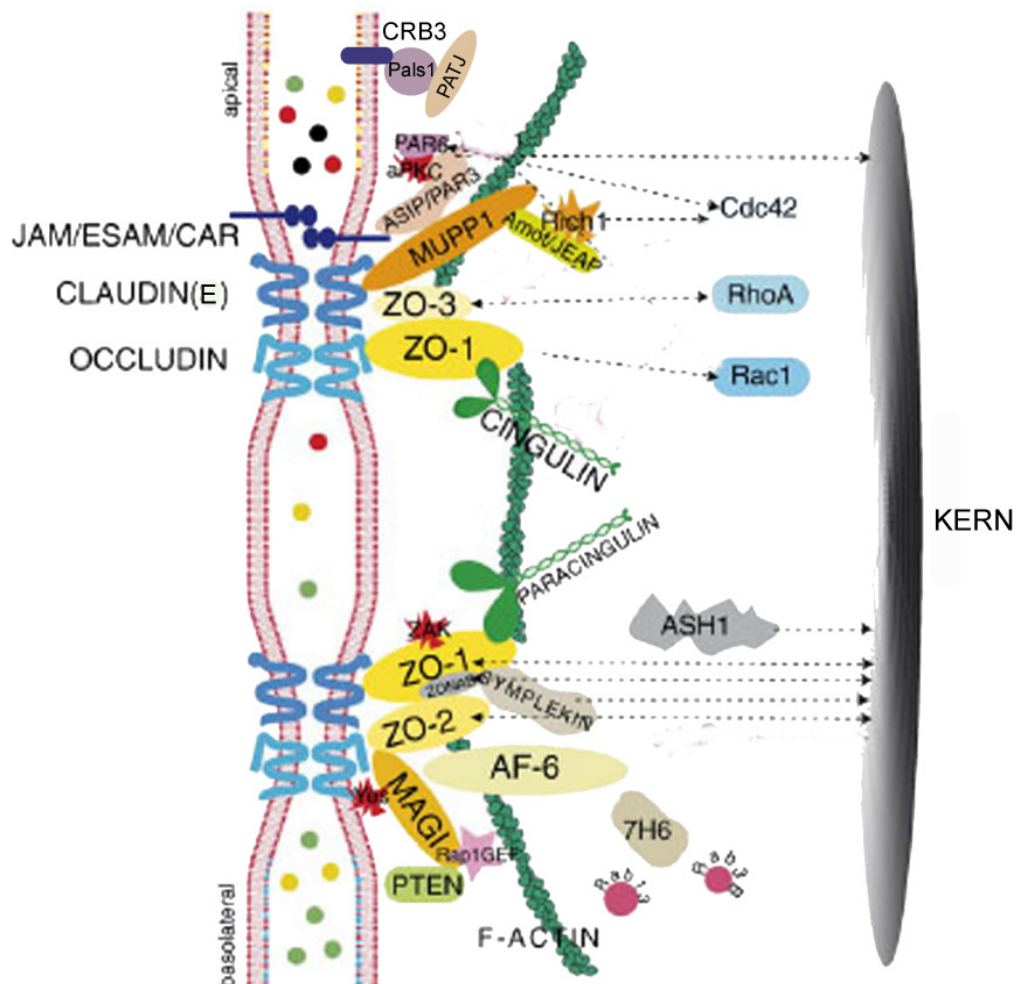


Abbildung 2: Proteine des *tight junction*-Komplexes (Guillemot et al., 08).

Schematische Darstellung der Proteine, die in den *tight junction*-Komplex involviert sind. Die Transmembranproteine (Claudine, Occludin, JAM, ESAM, CAR, Crumbs3) vermitteln die Zelladhäsion und sorgen für die Integrität der parazellulären Diffusionsbarriere. Eine Vielzahl von Gerüst- und Adapterproteinen (z. B. ZO-1, -2, -3, MAGI, AF-6, Cingulin, MUPP-1, PAR-3, PAR-6, PATJ, Pals1) sind mit den integralen Proteinen assoziiert und sorgen so für deren Verbindung mit dem Zytoskelett.

Durch die Interaktion der Membranproteine mit einer Vielzahl von Proteinen aus dem Zytoplasma sind *tight junctions* an der Regulation mannigfaltiger Prozesse wie dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Zellpolarität beteiligt (Kohler und Zahraoui, 05).

1.2.1 Transmembranproteine des *tight junction*-Komplexes

Als erstes integrales Membranprotein der *tight junctions* wurde Occludin im Jahre 1993 identifiziert (Furuse et al., 93). Das ca. 65 kDa große Protein gehört zu den Tetraspan-Proteinen. Die vier transmembranen Domänen werden durch zwei extrazelluläre und eine kurze zytoplasmatische Schleife verbunden. Der N- und C-Terminus von Occludin enden beide im Zytoplasma und sind aufgrund ihres hohen Anteils an Serinen, Threoninen und Tyrosinen Zielstrukturen zahlreicher Proteinkinasen (Schneeberger und Lynch, 04). An der Phosphorylierung von Occludin sind Proteinkinase C (PKC) (Andreeva et al., 01) und Proteinkinase CK2 (Cordenonsi et al., 99b), die Tyrosinkinase c-Yes (Chen et al., 02) sowie ein p34cdc2/cyclin B Komplex (Cordenonsi et al., 97) beteiligt. Die letzten 150 Aminosäuren des C-Terminus von Occludin interagieren direkt mit F-Actin (Wittchen et al., 99) als auch mit den zytosolischen *tight junction*-Proteinen zonula occludens 1 (ZO-1) (Furuse et al., 94), ZO-2 (Itoh et al., 99b) und ZO-3 (Haskins et al., 98). Die Funktion von Occludin ist nicht vollständig geklärt. Eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Barriere scheint es nicht zu spielen. Bei Occludin-*knock out*-Mäusen wurden keine strukturellen und funktionellen Abnormalitäten der *tight junctions* festgestellt. Allerdings zeigen die Mäuse ein verlangsamtes postnatales Wachstum und einen komplexen Phänotyp verschiedener Organe wie z. B. Entzündung der Magenschleimhaut, Verdünnung von Knochen und Verkalkung des Gehirns (Saitou et al., 00).

Die für die Ausbildung der Permeabilitätsbarriere wichtigsten Membranproteine der *tight junctions* gehören zu der Familie der Claudine, die mittlerweile 24 Mitglieder in Säugetieren umfasst. Die molekulare Masse der Claudine liegt zwischen 20-27 kDa. Wie Occludin gehören die Claudine zu den Tetraspan-Proteinen. Es sind jedoch keine Sequenzhomologien zwischen beiden Proteinen vorhanden. Die erste extrazelluläre Schleife der Claudine ist mit ca. 52 Aminosäuren (AS) wesentlich größer als die zweite (16-33 AS). Der kurze N-Terminus (ca. 7 AS) und der C-Terminus der Claudine lokalisiert intrazellulär, wobei die Länge des C-Terminus zwischen den verschiedenen Claudin-Isoformen variiert (21-63 AS) (van Itallie und Anderson, 06). Die Bedeutung der Claudine für die Ausbildung von *tight junction*-Strängen wurde durch die Transfektion von ursprünglich *tight junction*-freien L-Fibroblasten der Maus mit Claudin-1 und -2 gezeigt, da dadurch eine de novo Ausbildung der Stränge induziert wurde (Furuse et al., 98). Claudine bilden das molekulare

Rückgrat der parazellulären Diffusionsbarriere und sind zudem für die Regulation der selektiven Permeabilität dieser Barriere verantwortlich. Eine Selektivität besteht dabei sowohl für Moleküle unterschiedlicher Größe als auch für verschiedene Ionen. Es wird angenommen, dass die erste extrazelluläre Schleife der Claudine parazelluläre Poren bildet, die die Durchlässigkeit der Ionen bestimmen. Da die Isoformen der Claudine eine große Vielfalt in der Anzahl und Positionierung geladener Aminosäuren ihrer ersten extrazellulären Schleife aufweisen, zeigen verschiedenen Epithelien je nach Zusammensetzung der Claudine Unterschiede in der Ionenselektivität (van Itallie und Anderson, 06). Der Einfluss der Claudine auf die Größenselektivität wurde im Vergleich zur Ionenselektivität bisher wenig untersucht. Es wurde jedoch z. B. gezeigt, dass die Dichtheit der Blut-Hirn-Schranke in Claudin-5 *knock-out* Mäusen gegenüber kleinen Molekülen (< 800 Da) abnimmt (Nitta et al., 03).

Wie Claudine und Occludin weist auch Tricellulin (63,6 kDa) vier transmembranale Domänen sowie zwei extrazelluläre Schleifen auf, und der N- und C-Terminus lokalisiert im Zytoplasma. Die ca. 130 letzten Aminosäuren des C-Terminus von Tricellulin und Occludin sind konserviert. Tricellulin ist überwiegend an den Kontaktstellen von drei Epithelzellen lokalisiert (Abbildung 3).

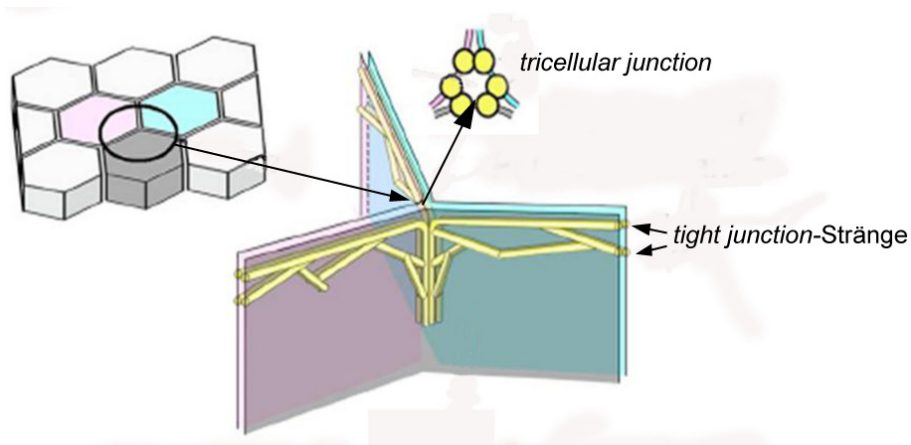


Abbildung 3: Lokalisierung von Tricellulin (Ikenouchi et al., 05)

Schematische Darstellung der Kontaktstellen von drei Epithelzellen, an denen Tricellulin lokalisiert ist.

Die Bedeutung von Tricellulin für die Integrität von *tight junctions* wurde gezeigt, indem die Expression von Tricellulin durch RNA-Interferenztechnik unterbunden wurde. In Zellen, die kein Tricellulin exprimieren, ist die Struktur der *tight junctions* modifiziert, da sowohl Occludin als auch Claudin-3 ihre Lokalisierung verändern. Die *tight junction*-Stränge erscheinen dünner und das Netzwerk der *tight junctions* ist nicht so kontinuierlich wie das des Wildtyps (Ikenouchi et al., 05). Da das Protein erst im Jahre 2005 entdeckt wurde, ist über die genaue Funktion und Interaktionen von Tricellulin wenig bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass der

mit Occludin homologe Bereich des C-Terminus von Tricellulin mit ZO-1 interagiert (Riazuddin et al., 06).

Neben den Tetraspan-Proteinen findet man in den *tight junctions* noch Vertreter der *cortical thymocyte marker in Xenopus* (CTX)-Subfamilie, die der Superfamilie der Immunoglobuline angehören. Die Proteine der CTX-Subfamilie sind Adhäsionsproteine mit nur einer Transmembrandomäne und zwei Immunoglobulin-ähnlichen extrazellulären Schleifen. Die C-Termini der Proteine der CTX-Familie reichen in das Zytoplasma, sind unterschiedlich lang und weisen verschiedene postsynaptic protein-95/discs large/zonula occludens (PDZ)-Bindemotive auf (Ebnet, 08). Dadurch können weitere Untergruppen dieser Subfamilie gebildet werden, wobei *junctional adhesion molecule* (JAM)-A, JAM-B und JAM-C eine Typ I PDZ-Domäne und *coxsackie and adenovirus receptor* (CAR), *CAR-like membrane protein* (CLMP), *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) und JAM-4 eine Typ II PDZ-Domäne besitzen (Chiba et al., 08). Bis auf CLMP wurde für alle Proteine gezeigt, dass sie mit *tight junction*-assoziierten Gerüstproteinen interagieren. Von CLMP wurde eine Ko-Lokalisation mit ZO-1 und Occludin beobachtet (Raschperger et al., 04). Im Gegensatz zu JAM-A ist über die anderen JAMs wenig bekannt. JAM-A ist ein 33 kDa großes, glykosyliertes Protein, das über seine PDZ-Domäne mit Afadin (AF)-6 (Ebnet et al., 00), *atypical PKC isotype-specific interacting protein* (ASIP)/*partitioning-defective protein 3* (PAR-3) (Ebnet et al., 01), Occludin und ZO-1 (Bazzoni et al., 00) interagiert. Außerdem wurde durch Ko-Immunpräzipitationen gezeigt, dass JAM-A mit Cingulin assoziiert (Bazzoni et al., 00). CAR immunpräzipitiert mit ZO-1 und darüber hinaus wurde eine Ko-Lokalisation von CAR mit ZO-1 an den *tight junctions* gezeigt (Cohen et al., 01). JAM-4 und ESAM interagieren mit einem *membrane-associated guanylate kinase inverted protein* (MAGI-1) (Hirabayashi et al., 03; Wegmann et al., 04).

Die dritte Klasse der integralen Membranproteine der *tight junctions* beinhaltet ausschließlich Crumbs3 (CRB3), ein 25 kDa großes Protein, das nur eine Transmembrandomäne besitzt. Der kurze extrazelluläre N-Terminus umfasst 36 AS und der zytoplasmatische C-Terminus hat eine Länge von 41 AS. CRB3 assoziiert direkt mit *protein associated with Lin seven 1* (Pals1) (Roh et al., 02) und PAR-6 (Lemmers et al., 04), die ihrerseits eine Rolle bei der Regulation der Zellpolarität spielen.

1.2.2 Gerüst- und Adapterproteine des *tight junction*-Komplexes

Ein charakteristisches Gerüstprotein ist ZO-1, das ein Mitglied der *membrane-associated guanylyl kinase* (MAGUK)-Familie ist. ZO-1 weist drei PDZ-Domänen sowie jeweils eine SH3- und GuK-Domäne auf. ZO-1 interagiert mit den integralen *tight junction*-Proteinen Occludin und CAR sowie mit Claudinen und JAMs (Bazzoni et al., 00; Cohen et al., 01;

Furuse et al., 94; Itoh et al., 99a). Neben Interaktionen mit einer Reihe von anderen zytoplasmatischen Proteinen, wie z. B. AF-6 (Yamamoto et al., 97), ZA-Kinase (ZAK) (Balda et al., 96) und Cingulin (Bazzoni et al., 00), wurden auch Wechselwirkungen von ZO-1 mit F-Actin beobachtet (Sonsino et al., 02). Darüber hinaus bildet ZO-1 mit ZO-2 und ZO-3 Komplexe, die ebenfalls sowohl mit Claudinen und Occludin als auch mit F-Actin interagieren (Wittchen et al., 99). Die ZO-Komplexe stellen das wichtigste Bindeglied der *tight junctions* mit dem Actin-Zytoskelett dar (Ebnet, 08). Ein Fehlen des kompletten ZO-Komplexes resultiert in einer mangelhaften Strangbildung sowie in der Abwesenheit von Occludin, Claudin-3 und JAM-A in den *tight junctions*, was zu einem völligen Verlust der Barrierefunktionalität führt (Umeda et al., 06). Ferner wurde gezeigt, dass ZO-1 während der Zellproliferation auch im Zellkern lokalisiert ist (Gottardi et al., 96).

Von den MAGI-Proteinen wurde bisher ausschließlich von MAGI-1 und -3 eine Lokalisation in den *tight junctions* beobachtet, wobei MAGI-1 direkt mit ZO-1 ko-lokalisiert (Ide et al., 99). MAGI-1 interagiert außerdem mit den putativen *tight junction*-Proteinen JAM-4 und ESAM (Hirabayashi et al., 03; Wegmann et al., 04).

Das *multi-PDZ domain protein 1* (MUPP-1) besitzt 13 PDZ-Domänen. Es ist an den *tight junctions* lokalisiert, wo es über seine verschiedenen PDZ-Domänen mit Claudinen, JAM-A, CAR und Crumbs interagiert. Die genaue Funktion von MUPP-1 ist nicht bekannt, obwohl vermutet wird, dass es aufgrund seiner zahlreichen Bindemotive als Gerüstprotein agiert (Coyne et al., 04; Hamazaki et al., 02; Jeansonne et al., 03; van de Pavert et al., 04).

Die Lokalisation des *CRB3/Pals1/Pals1-associated tight junction protein* (PATJ)-Komplexes an den *tight junctions* wird durch die direkte Interaktion von Pals1 mit der C-terminalen PDZ-Domäne von CRB3 vermittelt, und Pals1 interagiert wiederum direkt mit PATJ (Roh et al., 02). Es wird angenommen, dass der CBR/Pals1/PATJ-Komplex einen wichtigen Beitrag zur Integrität der *tight junctions* und Polarität von Epithelzellen liefert, da ein Ausschalten von PATJ zu einer Internalisierung von CRB3 und einer Umverteilung von anderen *tight junction*-Proteinen wie Occludin und ZO-3 führt (Michel et al., 05; Shin et al., 05).

PAR-3 und PAR-6 bilden zusammen mit aPKC einen funktionellen Komplex, der im Zusammenhang mit der Polarisierung von Epithelzellen während der Formierung der *tight junctions* steht (Gao et al., 02; Lin et al., 00). PAR-6 ist ein Adapterprotein, das die kleinen GTPasen *cell-division control protein 42* (Cdc42) und Rac1 mit der aPKC verbindet, was diese aktiviert (Yamanaka et al., 01). Mutationen der aPKC führen zu einer fehlerhaften Lokalisation von PAR-3 und schließlich zu einer Beeinträchtigung der Zellpolarisierung (Suzuki et al., 01). Die Interaktion von PAR-3 mit JAM-A sorgt für die Lokalisierung des Komplexes an den *tight junctions* (Itoh et al., 01).

Cingulin sorgt durch die Interaktionen seiner globulären Kopfdomänen mit Myosin und F-Actin sowie JAM-A und ZO-1 für eine Verbindung der *tight junctions* mit dem Zytoskelett

(Bazzoni et al., 00; Cordenonsi et al., 99a; D'Atri und Citi, 01). Cingulin-*knock out*-Epithelzellen zeigen keine morphologisch oder funktionell veränderte *tight junctions*. Es wird vermutet, dass Cingulin bei der Regulierung der Genexpression von *tight junction*-Proteinen eine Rolle spielt, da eine Herabregulierung von Cingulin die Genexpression von Claudin-2, -6, -7 und Occludin verändert (Guillemot et al., 04). Außerdem interagiert Cingulin mit AF-6 (Cordenonsi et al., 99a), das seinerseits mit ZO-1 und JAM-A assoziiert ist. Es wird angenommen, dass AF-6 wichtig für die Formierung der *tight junctions* ist, indem es JAM-A zu den Zell-Zell-Kontakten rekrutiert (Ebnet et al., 00).

1.2.3 Regulatorische Proteine des *tight junction*-Komplexes

An der zytoplasmatischen Seite der *tight junctions* sind zahlreiche regulatorische Proteine zu finden. Einerseits werden Signale vom Innenbereich der Zelle zu sich gerade formierenden oder bereits existierenden *tight junctions* vermittelt, um deren korrekte Zusammensetzung und Funktion zu regulieren. Andererseits gehen Signale von den *tight junctions* aus, um die Genexpression und Prozesse wie das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung zu regulieren (Matter und Balda, 03).

Die kleinen G-Proteine Rac1 und Cdc42 wurden bereits in Kapitel 1.2.2 in Zusammenhang mit dem PAR-3/aPKC/PAR-6-Komplex erwähnt. Eine Verbindung von Vertretern der Familie der Rho-Proteine wurde sowohl bei der Regulierung der Formierung der *tight junctions* als auch im Zusammenhang mit der Regulierung der parazellulären Permeabilität gefunden. Beispielsweise führt die Aktivierung von Rho A sowohl zu einer Verstärkung (Jou et al., 98) als auch zu einer Schwächung der *tight junction*-Permeabilität (Hasegawa et al., 99). Von den heterotrimeren G-Proteinen $G_{\alpha_{12}}$ und $G_{\alpha_{12}}$ wurde eine Ko-Lokalisation mit ZO-1 beobachtet, wobei $G_{\alpha_{12}}$ in die Regulierung der parazellulären Permeabilität involviert sein soll (Meyer et al., 02; Saha et al., 98). Über die Funktion der *tight junction*-assoziierten Rab-Proteine ist wenig bekannt. Von Rab13 und Rab3b wird angenommen, dass sie bei der Endozytose der *tight junctions* eine Rolle spielen (Weber et al., 94). Rab13 assoziiert mit zytoplasmatischen Vesikeln und ko-lokalisiert darüber hinaus mit ZO-1 (Zahraoui et al., 94). Ferner vermittelt Rab13 die Endozytose und Relokalisation von Occludin in den *tight junctions* (Morimoto et al., 05). Weitere in Vesikeltransport involvierte Proteine, von denen ebenfalls eine Assoziation mit den *tight junctions* beobachtet wurde, sind Sec 6/8 (Grindstaff et al., 98) und *vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein (VAP)-3*, das direkt an den C-Terminus von Occludin bindet (Lapierre et al., 99).

Neben Vertretern der PKC-Familie und der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die sowohl beim Auf- als auch beim Abbau der *tight junctions* eine Rolle spielen, wurden noch weitere Kinasen mit den *tight junctions* in Zusammenhang gebracht (Matter und Balda, 03).

Während ZAK an ZO-1 bindet (Balda et al., 96), phosphoryliert die Kinase *With No K (lysine) 4* (WNK4) Claudine (Yamauchi et al., 04). Grundvoraussetzung für die Lokalisation von Occludin in den *tight junctions* ist dessen Phosphorylierung, an der unter anderem auch die Tyrosinkinase c-Yes beteiligt ist (Chen et al., 02).

Aufgrund der Entdeckung *tight junction*-assoziierter Transkriptionsfaktoren wird vermutet, dass *tight junctions* einen direkten Einfluss auf die Expression von Genen und die Zellproliferation ausüben. ZO-1 bindet an den Y-Box-Transkriptionsfaktor *ZO-1-associated nucleic-acid binding* (ZONAB). Diese Interaktion reguliert den Promotor von *erb-2*, einem Tyrosinkinase-Rezeptor, der bei der Differenzierung von Epithelzellen eine Rolle spielt. In Zellen, die eine hohe Zelldichte und Expression von ZO-1 aufweisen, wird ZONAB gering exprimiert und ko-lokalisiert überwiegend mit ZO-1 in den *tight junctions*. Dagegen lokalisiert ZONAB im Zellkern, wenn die Zelldichte und die Expression von ZO-1 gering ist, und agiert dort als Repressor des *erb-2*-Gens. Durch die Interaktion von ZONAB mit ZO-1 wird die Expression eines für die Differenzierung von Epithelzellen wichtigen Gens direkt in Abhängigkeit von der Zelldichte reguliert (Balda und Matter, 00; Balda und Matter, 03). ZONAB bildet auch Komplexe mit Symplexin, das sowohl im Zellkern als auch in Assoziation mit *tight junctions* in polarisierten Epithelzellen gefunden wurde (Keon et al., 96). Der Mechanismus, durch den Symplexin zu den *tight junctions* rekrutiert wird und die Rolle, die es bei der Funktion der *tight junctions* spielt, wurde bisher nicht gezeigt.

1.3 Interaktionen von Claudinen

Es wurden bereits eine Vielzahl von Interaktionen, an denen Claudine beteiligt sind, charakterisiert. Diese Interaktionen schließen sowohl Wechselwirkungen der Claudine untereinander als auch mit anderen Proteinen ein.

1.3.1 Claudin-Claudin-Interaktionen

Interaktionen von Claudinen miteinander und die Bildung von Claudin-Polymeren innerhalb einer und zwischen gegenüberliegenden Plasmamembranen sind für die Bildung der *tight junction*-Stränge verantwortlich. Claudine innerhalb der Membran derselben Zellen treten über *cis*-Interaktionen (*side-by-side*) miteinander in Wechselwirkungen. Über *trans*-Interaktionen (*head-to-head*) agieren die Claudine zweier benachbarter Plasmamembranen miteinander. Es kommt sowohl zu Wechselwirkungen zwischen den Isoformen gleicher Claudine (homophil) als auch zwischen den Isoformen verschiedener Claudine (heterophil) (Furuse et al., 99). Hinweise auf homophile Interaktionen von Claudinen wurden nach der Solubilisierung von Claudin-4 mit Perfluorooctansäure (PFO) beobachtet, da anschließend

Claudin-4–Oligomere in SDS-Gelen gefunden wurden (Mitic et al., 03). In einem analogen Ansatz wurde ferner gezeigt, dass Claudin-1 und -3 vorwiegend als Monomer auftreten, während mittels einer PFO-PAGE verschiedene Oligomere von Claudin-5 gezeigt wurden (Coyne et al., 03). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiertes Claudin-5 innerhalb einer Plasmamembran ko-lokalisiert, einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) erzeugt, und dass rekombinante Fusionsproteine der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 in vitro Dimere bilden (Blasig et al., 06).

Heterophile Interaktionen von Claudinen scheinen nur zwischen bestimmten Isoformen vorzukommen. Während Claudin-1 und -3 sowie Claudin-3 und -5 ko-immunpräzipitieren, wurde keine Interaktion von Claudin-1 und -5 mittels Ko-Immunpräzipitation festgestellt (Coyne et al., 03). In Ko-Kulturen stabil transfizierter L-Fibroblasten wurden durch Immunfluoreszenz heterophile *trans*-Interaktionen zwischen Claudin-1 und -3 sowie zwischen Claudin-2 und -3 beobachtet. Wechselwirkungen zwischen Claudin-1 und -2 treten dagegen nicht auf (Furuse et al., 99). Es wurden keine heterophilen *trans*-Interaktionen von Claudin-4, weder mit Claudin-1 noch mit Claudin-3, gezeigt, obwohl die extrazellulären Schleifen von Claudin-4 und -3 große Homologien aufweisen (Daugherty et al., 07).

1.3.2 Interaktionspartner der Claudine

Claudine weisen diverse funktionelle Motive auf (Abbildung 4), die hoch konserviert zwischen den Isoformen vorkommen können oder charakteristisch für einzelne Claudine sind. Dies lässt auf eine Vielzahl gleicher aber auch unterschiedlicher Bindungspartner schließen (van Itallie und Anderson, 06).

Die letzten Aminosäuren des C-Terminus sind bei allen Claudinen, mit Ausnahme von Claudin-12, hoch konserviert und verfügen über PDZ-Erkennungssequenzen, durch die Bindungen an Proteine mit PDZ-Domänen ermöglicht werden (Gonzalez-Mariscal et al., 03). Claudin-1 bis -8 interagieren mit den ZO-Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3, die über drei PDZ-Domänen verfügen (Itoh et al., 99a). Ferner wurden Wechselwirkungen von Claudin-1, -5 und -8 mit MUPP1 gezeigt, das 13 PDZ-Domänen hat (Hamazaki et al., 02; Jeansonne et al., 03; Poliak et al., 02). PATJ ist ein weiteres Protein mit einer PDZ-Domäne, das mit Claudin-1 interagiert (Roh et al., 02).

Die Mehrzahl der Claudine tragen auf ihrem C-Terminus potentielle Serin- und/oder Threonin–Phosphorylierungsstellen. Claudin-1 wird am Thr-206 von der PKC phosphoryliert (Nunbhakdi-Craig et al., 02; Simard et al., 06). Diese Phosphorylierungsstelle liegt konserviert in humanem Claudin-2, -7, -8, -16 und -17 vor (Gonzalez-Mariscal et al., 08). Die

Phosphorylierung von Claudin-5 durch PKA am Thr-207 führt zu einer erhöhten Barrierefunktion der *tight junctions* (Ishizaki et al., 03).

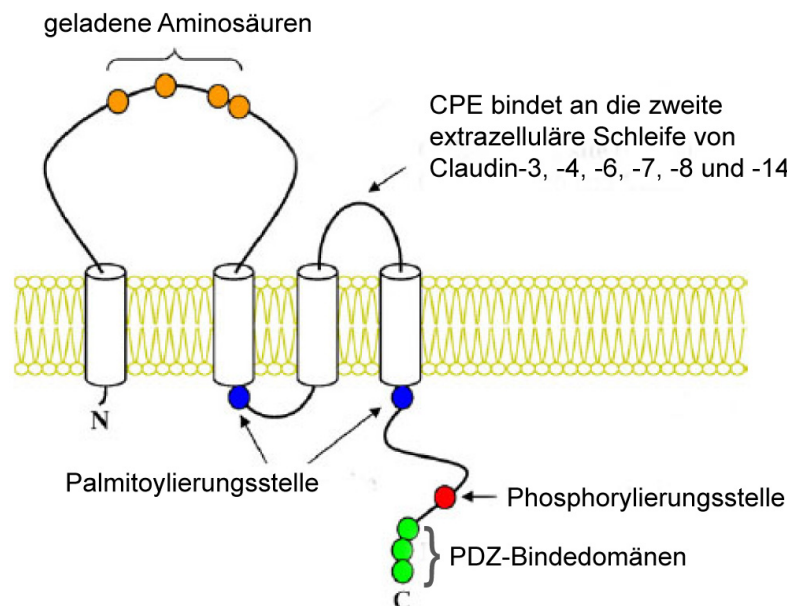


Abbildung 4: Funktionelle Motive der Claudine (Chiba et al., 08).

Die Isoformen der Claudine weisen Unterschiede in der Anzahl und Positionierung der geladenen Aminosäuren ihrer ersten extrazellulären Schleife auf. In der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3, -4, -6, -7, -8 und -14 befindet sich die Bindedomäne für das *Clostridium Perfringens* Enterotoxin. Auf der zytosomatischen Seite befinden sich in kurzer Distanz zur Plasmamembran zwei Palmitoylierungsstellen. Der C-Terminus enthält Phosphorylierungsstellen und PDZ-Bindedomänen.

PKA phosphoryliert außerdem Claudin-16 am Ser-217, was essentiell für die Rekrutierung von Claudin-16 zu den *tight junctions* ist (Ikari et al., 06). Die Phosphorylierung von Claudin-3 am Thr-192 durch PKA führt zu einer verstärkten Lokalisation von Claudin-3 im Zytoplasma und zu einer Fehlfunktion der Barriere (D'Souza et al., 05). Es wurde ferner gezeigt, dass die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Claudin-1 am Thr-203 phosphoryliert, was zu einer erhöhten Barrierefunktion der *tight junctions* führt (Fujibe et al., 04). Die Phosphorylierung von Occludin und Claudin-5 durch die *myosin light chain kinase* (MLCK) verursacht eine erhöhte Durchlässigkeit der *tight junctions* (Haorah et al., 05). WNK4 lokalisiert an den *tight junctions* und phosphoryliert dort Claudin-1 bis -4. Da als Folge eine erhöhte parazelluläre Permeabilität gegenüber Cl⁻-Ionen festgestellt wurde, wird angenommen, dass WNK4 den parazellulären Ionenfluss reguliert (Yamauchi et al., 04). Darüber hinaus interagiert Claudin-4 mit den Liganden der Ephrin-Rezeptoren, einer Familie von Tyrosinkinase-Rezeptoren. Durch die Bindung an die erste extrazelluläre Schleife von Claudin-4 wird die Kinaseaktivität von Ephrin-A2 stimuliert und Claudin-4 am Tyr-208 phosphoryliert (Tanaka et al., 05a). Diese Phosphorylierungsstelle liegt konserviert auch in humanem Claudin-1, -9, -14, -16, -17 und -20 vor (Gonzalez-Mariscal et al., 08). Durch die Phosphorylierung wird die Interaktion von Claudin-4 mit ZO-1 unterbunden, was zu einem Verlust von Claudin-4 an den Zell-Zell-

Kontakten und zu einer erhöhten Permeabilität der *tight junctions* führt. Ephrin-B1 bildet in vivo mit benachbartem Claudin-1 bis -4 über deren extrazelluläre Schleifen Komplexe (Tanaka et al., 05b).

Weitere Enzyme mit denen Claudine in Wechselwirkungen treten sind die Matrix-Metalloproteasen (MMP). Matrix-Metalloproteasen sind am kontrollierten Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix beteiligt, einem wichtigen Prozess bei der Zellwanderung und Wundheilung (Fillmore et al., 01). Anhand von Immunpräzipitationen wurde gezeigt, dass Claudin-1 direkt mit MMP2 und Membran Typ 1-MMP (MT1-MMP) interagiert. Die genaue Funktion dieser Interaktionen ist nicht bekannt. Es wird angenommen, dass Claudine bei der Aktivierung der MMP eine Rolle spielen, indem sie für eine Verlagerung von MMP2 und MT1-MMP an die Zellmembran sorgen (Miyamori et al., 01).

Außerdem wurde gezeigt, dass die *gap junction*-Proteine Connexin40 und Connexin43 mit Claudin-5 ko-lokalisieren und ko-immunpräzipitieren und vermutlich für die Integrität der Diffusionsbarriere notwendig sind (Nagasawa et al., 06). Ferner ko-lokalisiert und ko-immunpräzipitiert Claudin-1 mit Connexin32 (Kojima et al., 01).

Das *oligodendrocyte-specific protein* (OSP)/Claudin-11 ist ausschließlich in der Myelinscheide der Oligodendrocyten im Zentralnervensystem sowie in Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem lokalisiert, wo es *tight junction*-ähnliche Strukturen bildet (Bronstein et al., 96; Morita et al., 99b). OSP/Claudin-11 interagiert mit einem Mitglied der Familie der Tetraspanine, das als *OSP/Claudin-11-associated protein 1* (OAP-1) bezeichnet wird (Tiwari-Woodruff et al., 01).

Es wird angenommen, dass Claudine auch mit Occludin Wechselwirkungen eingehen. Während die Transfektion von Claudin-1 und -2 in L-Fibroblasten der Maus zu der Formierung eines *tight junction*-Netzwerkes führt, induziert die alleinige Transfektion von Occludin in L-Fibroblasten ausschließlich die Bildung von kurzen *tight junction*-ähnlichen Strukturen (Furuse et al., 99). Occludin wird jedoch in die *tight junction*-Stränge der Claudine integriert, wenn L-Fibroblasten mit Occludin und Claudinen ko-transfiziert werden. Ergänzend bindet ein Peptid, das der zweiten extrazellulären Schleife von Occludin entspricht, *in vitro* an die erste extrazelluläre Schleife von Claudin-1 (Nusrat et al., 05).

1.3.3 Claudine sind Rezeptoren des *Clostridium perfringens* Enterotoxins

Claudine fungieren im Darmepithel als Rezeptoren für das Enterotoxin des Bakteriums *Clostridium perfringens* Typ A, einem der häufigsten Auslöser von Nahrungsmittelvergiftungen. Das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) besteht aus

einer einzelnen Polypeptidkette von 319 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von ca. 35 kDa (Czeczulin et al., 93). Das Enterotoxin schädigt durch Zelllyse das Darmepithel, was zu Magen-Darm-Symptomen wie schwerem Durchfall führt (McClane und Chakrabarti, 04).

Die CPE-Rezeptoren wurden durch Versuche an L-Fibroblasten der Maus näher charakterisiert. Obwohl die Zellen normalerweise keine Reaktion mit dem CPE zeigen, entwickeln sie durch die Transfektion mit RVPI (*rat ventral prostate-1*) und CPE-R (*CPE-receptor*) eine Sensitivität gegenüber CPE (Katahira et al., 97a; Katahira et al., 97b). Nach der Entdeckung von Claudin-1 und -2 fand man Sequenzähnlichkeiten zwischen den Claudinen und den beiden Rezeptoren, so dass diese fortan als Claudin-3 und Claudin-4 bezeichnet wurden (Furuse et al., 98; Morita et al., 99a). Eine Bindung von CPE wurde an weitere, jedoch nicht an alle Claudine beobachtet. Anhand von transfizierten L-Fibroblasten der Maus wurde gezeigt, dass Claudin-3, -4, -6, -7, -8 und -14 mit CPE interagieren, während CPE nicht an Claudin-1, -2, -5 und -10 bindet (Fujita et al., 00). Darüber hinaus wurden auch unterschiedliche Affinitäten der bindenden Claudine gegenüber dem CPE beobachtet (Tabelle 1) (Fujita et al., 00; Sonoda et al., 99).

Tabelle 1: Assoziationskonstanten der Interaktion der verschiedenen Claudine mit CPE.

Claudin	Assoziationskonstante
Claudin-4	$1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
Claudin-6	$9,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
Claudin-7	$8,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
Claudin-3	$8,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
Claudin-14	$3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Claudin-8	$1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$

Anhand von Claudin-1/-3-Chimären wurde durch Immunpräzipitationen gezeigt, dass CPE an die zweite extrazelluläre Schleife der Claudine bindet. Während CPE nicht mit einem Konstrukt, das die erste extrazelluläre Schleife von Claudin-3 und die zweite extrazelluläre Schleife von Claudin-1 enthält, interagiert, wurde eine Bindung des CPE an eine Chimäre beobachtet, das die erste extrazelluläre Schleife von Claudin-1 sowie die zweite extrazelluläre Schleife von Claudin-3 enthält (Fujita et al., 00). Seine zytotoxische Wirkung entfaltet CPE in einem mehrstufigen Prozess, der mit der Bindung an die Claudin-Rezeptoren im Epithel des Ileums beginnt. Anschließend kommt es sukzessiv zur Ausbildung eines porenähnlichen Komplexes, der die Plasmamembran durchdringt und die Permeabilität der Membran verändert, indem er Kanäle in die Membran einbaut. Es kommt zu einem Calcium-Einstrom, der schließlich zum Zelltod durch Apoptose oder Onkose führt (Chakrabarti und McClane, 05).

Das CPE-Polypeptid wurde funktionell in zwei Hauptbereiche unterteilt. Der Abschnitt des CPE, der für die Bindung mit Claudinen verantwortlich ist, befindet sich innerhalb der letzten 30 Aminosäuren des C-Terminus (Hanna et al., 91). CPE-Fragmente, die um die letzten 5, 10, 16 oder 30 Aminosäuren verkürzt werden, verlieren ihre Fähigkeit an Claudine zu binden (Kokai-Kun und McClane, 97; Takahashi et al., 05). Die Aufklärung der Struktur eines CPE-Fragments, das die AS 194-319 umfasst, zeigte, dass dieser Abschnitt in einem neunsträngigen *beta-sandwich* vorliegt. Ähnliche Strukturen wurden auch in den Rezeptor-Bindedomänen anderer sporenbildender Toxine wie z. B. dem des *Bacillus thuringiensis* gefunden (van Itallie et al., 08). Der zweite funktionelle Bereich des CPE befindet sich am N-Terminus. In diesem Bereich liegen die Abschnitte des CPE, die für die Komplex-Bildung, die Insertion des Komplexes in die Membran und letztendlich die Zytotoxizität verantwortlich sind (Masuyama et al., 05).

1.4 Proteomanalysen

Der Begriff „Proteom“ wurde in den 90er Jahren von Mark Wilkins geprägt als er analog zum Genom nach einer Bezeichnung für das Expressionsmuster von Proteinen suchte (Wilkins et al., 96). Im Gegensatz zum Genom, das eine statische Ansammlung von Genen ist, ist das Proteom ein hochdynamisches System, das eine von der Umwelt abhängige Momentaufnahme der Proteinexpression liefert. Als Proteom wird die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus, eines Gewebes, einer Zelle oder eines Zellkompartiments zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen bezeichnet. Die im Gegensatz zum Genom große Komplexität des Proteinexpressionsmusters hat ihren Ursprung in der Degradierung von Proteinen und einer Vielzahl post-translationaler Modifizierungen (z. B. Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Ubiquitinierungen), denen Proteine unterzogen werden. Dies hat zur Folge, dass den rund 30 000 Genen des humanen Organismus mehr als 500 000 Proteine gegenüberstehen (Bauer und Kuster, 03; Berggard et al., 07). Die ausschließliche Anwendung von Genom- und Transkriptomanalysen ist für die Aufklärung von zellulären Prozessen nicht ausreichend. Das Proteom stellt ein direkteres Bild der Aktivitäten in den Zellen dar, da Proteine nicht nur die Strukturkomponenten der Zellen sind, sondern nahezu alle Funktionen in der Zelle ausführen (Bauer und Kuster, 03). Die biologischen Prozesse in der Zelle werden durch ein dynamisches Netzwerk von Signalkaskaden miteinander interagierender Proteine reguliert. Proteomanalysen beinhalten die Erstellung von Proteinprofilen mit dem Ziel, die Hintergründe gegebener biologischer Phänomene zu entschlüsseln (Gingras et al., 07). Dazu werden in der Proteomik verschiedene Ansätze verfolgt. Durch differentielle Proteomanalysen wird die Proteinexpression, die den normalen Bedingungen entspricht, mit Proteinmustern verglichen,

die nach einer Behandlung (z. B. Hypoxie) oder durch pathologische Veränderungen entstanden sind. Das Ziel ist die Identifizierung regulierter Proteine, die eine Interpretation der Ursachen und Mechanismen der Veränderungen erlauben. Die funktionelle Proteomik beschäftigt sich mit der Aufklärung und Entschlüsselung von Protein-Interaktionen, Protein-Komplexen und Protein-Signalwegen (de Hoog und Mann, 04).

1.4.1 Methoden der Proteomanalyse

Die Erforschung von Proteomen erfordert zumeist eine Auftrennung hochkomplexer Proteingemische auf der Protein- und/oder Peptidebene bevor im Regelfall eine massenspektrometrische Identifizierung durchgeführt wird. Dafür steht ein breitgefächertes Methodenspektrum zu Verfügung, wovon im Folgenden drei häufig benutzte Kombinationen vorgestellt werden (Yang et al., 08).

Der klassische Ansatz für die Analyse von Proteomen ist eine Kombination von zweidimensionaler (2D)-Gelelektrophorese mit MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*) Massenspektrometrie (MS). Die Auftrennung von Proteinen mittels 2D-Gelelektrophorese erfolgt durch zwei, voneinander unabhängigen Parameter: in der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrer Masse separiert (Klose, 75; O'Farrell, 75). Nach einer Proteinfärbung werden Proteinspots von Interesse ausgeschnitten und die Proteine im Gel durch Endoproteasen (z. B. Trypsin) in Peptidfragmente gespalten. Die Peptide werden eluiert und durch MALDI-TOF MS analysiert, indem die Peptidmassen ermittelt werden. Für die Identifizierung der Proteine wird dieser sogenannte Massenfingerabdruck (peptide mass fingerprint, PMF) mit den Massen theoretisch gespaltenen Proteine, die in entsprechenden Datenbanken vorliegen, abgeglichen (Wheeler et al., 96). Die Vorteile von 2D-Gelen liegen in einer großen Auflösung (> 2000 spots/Gel) und in der Möglichkeit, post-translationale Modifikationen aufzeigen zu können (Gorg et al., 04). Dagegen hat die 2D-Gelelektrophorese die Nachteile, dass der dynamische Bereich begrenzt ist und die Sensitivität für gering exprimierte Proteine schwach ist (Anderson und Anderson, 98; Corthals et al., 00). Außerdem werden Proteine mit extremen Eigenschaften (hinsichtlich Größe und isoelektrischem Punkt) nicht erfasst (Gorg et al., 04). Kritisch wird die 2D-Gelelektrophorese auch im Zusammenhang mit hydrophoben Proteinen gesehen. So ist von Membranproteinen bekannt, dass sie bei der isoelektrischen Fokussierung irreversible präzipitieren und daher ihre Auftrennung mit 2D-Gelen nicht möglich ist (Santoni et al., 00).

Erhebliche Vorteile bietet die Identifizierung von Proteinen durch LC (*liquid chromatography*)-Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) (Hart und Gaskell, 05). Dabei können sowohl Gel-basierende als auch Gel-freie Separationstechniken verwendet werden. Wolters et al. haben

eine Gel-freie, mehrdimensionale nano-LC Methode mit einer direkten Kopplung an die MS entwickelt (Wolters et al., 01). Durch eine mehrfache, chromatographische Separation auf der Peptidebene erlaubt die sogenannte MudPIT (*multidimensional protein identification technology*) die Analyse sehr komplexer Mischungen. Die Peptide werden auf einen Kationenaustauscher gegeben und durch einen Salzstufengradienten sukzessive auf eine Umkehrphasen-Säule gewaschen. Von dort werden die Peptide mittels eines Gradienten direkt in das LC-ESI (*electrospray ionization*)-Massenspektrometer eluiert. Für die Analyse sehr komplexer Peptidgemische wird in der Regel eine MS/MS durchgeführt (Yates, III et al., 97). Bei der MS/MS werden die Peptide, nachdem ein Massenfingerabdruck erstellt wurde, durch Kollision mit Argonatomen fragmentiert. Im Idealfall entstehen dabei Peptidfragmente, die sich in ihrer Länge in nur einer Aminosäure unterscheiden und dadurch Rückschlüsse auf die Sequenz erlauben. Somit stehen nach der MS/MS neben den Peptidmassen auch Informationen über die Sequenz der Peptide zur Verfügung, wodurch eine zuverlässigere Identifizierung durch den Abgleich mit den theoretischen Werten der Datenbank sichergestellt wird (Yates, III et al., 95).

Alternativ kann auf Proteinebene vor der MS/MS als Gel-basierendes Separationsverfahren eine eindimensionale (1D) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt werden. Das Gel wird anschließend in Stücke zerschnitten und die Proteine im Gel verdaut, bevor die Peptide durch LC-ESI-MS/MS wie oben beschrieben analysiert werden (Hart und Gaskell, 05).

Durch die LC-MS/MS Methoden werden einige Nachteile der 2D-Gelelektrophorese/PMF-Technologie überwunden. Der dynamische Bereich ist wesentlich größer, da er durch die Massenspektrometrie bestimmt wird. Es können sowohl komplexere Proteingemische analysiert werden als auch geringer-abundante Proteine, und es wird eine wesentlich bessere Auftrennung von Membranproteinen ermöglicht. Die methodische Durchführung der MudPIT ist jedoch nicht ganz einfach. Einen guten Kompromiß zwischen der Erfassung komplexer Proteinproben und der Praktikabilität stellt daher die Kombination aus 1D-SDS-PAGE und LC-ESI-MS/MS, besonders auch im Hinblick auf die Analyse von Membranproteinen, dar (Yang et al., 08).

1.4.2 Anreicherung von Proteinen in Subproteomen

Obwohl die Technologien für die Proteomik fortlaufend weiterentwickelt werden und an Sensitivität gewinnen, erlaubt keine der verfügbaren Methoden die Analyse des gesamten Proteoms höherer Organismen in einem einzigen Schritt. Eine große Herausforderung für Proteomanalysen stellen nach wie vor die große Komplexität der Proteine und der hohe dynamische Bereich dar. In einer Zelle können bis zu 100 000 verschiedene Proteine mit den

verschiedensten chemischen und physikalischen Eigenschaften vorkommen, deren Abundanz sich um sieben bis zehn Größenordnungen unterscheiden kann (Schirle et al., 03). Zu den hoch-abundanten Proteinen zählen in der Regel Proteine, die allen Zelltypen gemeinsam sind, wie z. B. die Strukturproteine der Chromosomen, RNA-Polymerasen, DNA-Reparaturenzyme, ribosomale Proteine sowie viele Proteine des Zytoskeletts. Regulatorische Proteine wie Kinasen, Phosphatasen oder GTPasen gehören eher zu den gering-abundanten Proteinen. Sie werden in der Massenspektrometrie häufig nicht identifiziert, da sie von hoch-abundanten Proteinen überdeckt werden (Bauer und Kuster, 03; Stasyk und Huber, 04).

Um die Komplexität von Proteingemischen zu reduzieren und gering-abundante Proteine anzureichern, werden im Rahmen von Proteomanalysen üblicherweise Vorfractionierungen durchgeführt. Dadurch werden sogenannte Subproteome gewonnen, die eine spezifischere und sensitivere Analyse erlauben. Dabei können die unterschiedlichsten Ziele verfolgt werden. Subzelluläre Proteomanalysen konzentrieren sich z. B. nur auf Proteine von Zellorganellen wie den Mitochondrien oder dem Kern, aber auch subzelluläre Strukturen wie Synapsen oder Mikrodomänen wie den *lipid-rafts* (Dreger, 03). Andere Strategien können beispielsweise ausschließlich auf die Anreicherung von Proteinen mit bestimmten Modifikationen abzielen (Phosphoproteine, Glykoproteine) (Stasyk und Huber, 04). Eine bereits sehr erfolgreiche Form der Analyse von Subproteomen ist die Charakterisierung einzelner Protein-Komplexe.

1.4.3 Proteomische Charakterisierung von Protein-Komplexen

Die biologische Funktion von Proteinen wird im Regelfall durch Wechselwirkungen in mehr oder weniger stabilen funktionellen Komplexen realisiert. Die Entschlüsselung der Komposition und Regulation solcher Komplexe liefert wertvolle Hinweise auf die Funktion von Proteinen und die Hintergründe biologischer Ereignisse (Gingras et al., 07). Im Rahmen von Proteomanalysen können Protein-Komplexe durch Affinitätsreinigungen isoliert werden. Durch die Immobilisierung eines bekannten Proteins eines Komplexes (Köder) an Trägermaterial können Interaktionspartner und assoziierte Proteine (Beute) aus einem Proteingemisch (meist ein Zelllysate) separiert werden. So werden beispielsweise Ko-Immunpräzipitationen für die Anreicherung von Protein-Komplexen eingesetzt, indem ein immobilisierter Antikörper als Köder benutzt wird, der spezifisch ein Epitop eines bereits bekannten Proteins des zu analysierenden Komplexes erkennt. Eine alternative Methode für die Anreicherung von Protein-Komplexen stellt die Affinitätsreinigung mit einem Köderprotein dar. Für diese Methode wird das Protein, dessen Interaktionen analysiert werden sollen, als rekombinantes Fusionsprotein mit einem Affinitätsepitop, z. B. Glutathion-S-Transferase

(GST), überexprimiert und an einen festen Träger immobilisiert. Dazu wird ein Proteingemisch gegeben, aus dem die Interaktionspartner durch Bindung an das Fusionsprotein isoliert werden (Bauer und Kuster, 03). Für umfangreichere Charakterisierungen von Protein-Komplexen und Protein-Netzwerken eignet sich die Tandem-Affinitätsreinigung (*tandem affinity purification*, TAP). Bei dieser Methode wird das Köderprotein mit zwei verschiedenen Affinitätsepitopen versehen, so dass nach der Inkubation mit dem Zelllysate zwei aufeinanderfolgende Affinitätsreinigungen mit unterschiedlichen Matrices durchgeführt werden können. Dadurch können Proteine, die unspezifisch an das Trägermaterial binden, erheblich reduziert werden (Gingras et al., 05).

Eine große Herausforderung bei allen auf Affinitätsreinigungen basierenden Proteomanalysen stellt die Unterscheidung zwischen potentiellen Interaktionspartnern und Verunreinigungen, d. h. zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung, dar. Eine Diskriminierung der unspezifischen Interaktionspartner ist durch die Markierung der Proben- oder Kontrollfraktion mit stabilen Isotopen (^{13}C , ^2H , ^{15}N , ^{18}O) möglich. Der Einbau schwerer Isotope führt zu einer Erhöhung der molekularen Masse der Peptide und einer entsprechenden Verschiebung des Signals im Massenspektrum. Die relativen Intensitäten der beiden MS-Signale verhalten sich proportional zur Menge der ansonsten identischen Peptide. Ein Vergleich der Signalintensitäten der beiden Peptide ermöglicht eine Aussage darüber, ob das zugehörige Protein nur in der Probe enthalten ist und damit spezifisch angereichert wurde oder ob es sowohl in der Probe als auch in der Kontrolle vorhanden ist und dadurch unspezifisch gebunden hat. Je nach Art und Weise des Einbaus der Isotopen lassen sich chemische, enzymatische und metabolische Markierungsverfahren unterscheiden (Abbildung 5) (Goshe und Smith, 03; Tao und Aebersold, 03).

Bei der ICAT-Technik (*isotope coded affinity tags*) werden an die Cysteine der Proteine Biotin-*tags* gebunden, die aus Biotin, einer Iodacetamidgruppe und einem dazwischenliegenden Linker bestehen. Die Iodacetamidgruppe reagiert mit den Cysteinresten der Proteine und markiert sie über den Linker mit Biotin. Die Proteine der Probe bzw. der Kontrolle unterscheiden sich im Linker, der in schwerer bzw. leichter Form eingesetzt wird (Gygi et al., 99). Die ^{18}O -Markierung erfolgt während der enzymatischen Spaltung der Proteine durch Trypsin über den Einbau zweier ^{18}O -Atome am Carboxyl-Terminus der Peptide (Schnolzer et al., 96). Für die metabolische Isotopen-Markierung (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, SILAC) werden zwei Populationen an Zellen parallel entweder in Anwesenheit von leichten Aminosäuren und den entsprechenden schweren Aminosäuren kultiviert. Dabei werden häufig die in der Zellkultur essentiellen Aminosäuren Lysin und/oder Arginin verwendet (Ong et al., 02; Ong et al., 03). Während der Affinitätsreinigung werden das Köderprotein und das bloße Affinitätsepitop der Kontrolle mit unterschiedlich markierten Zelllysaten inkubiert.

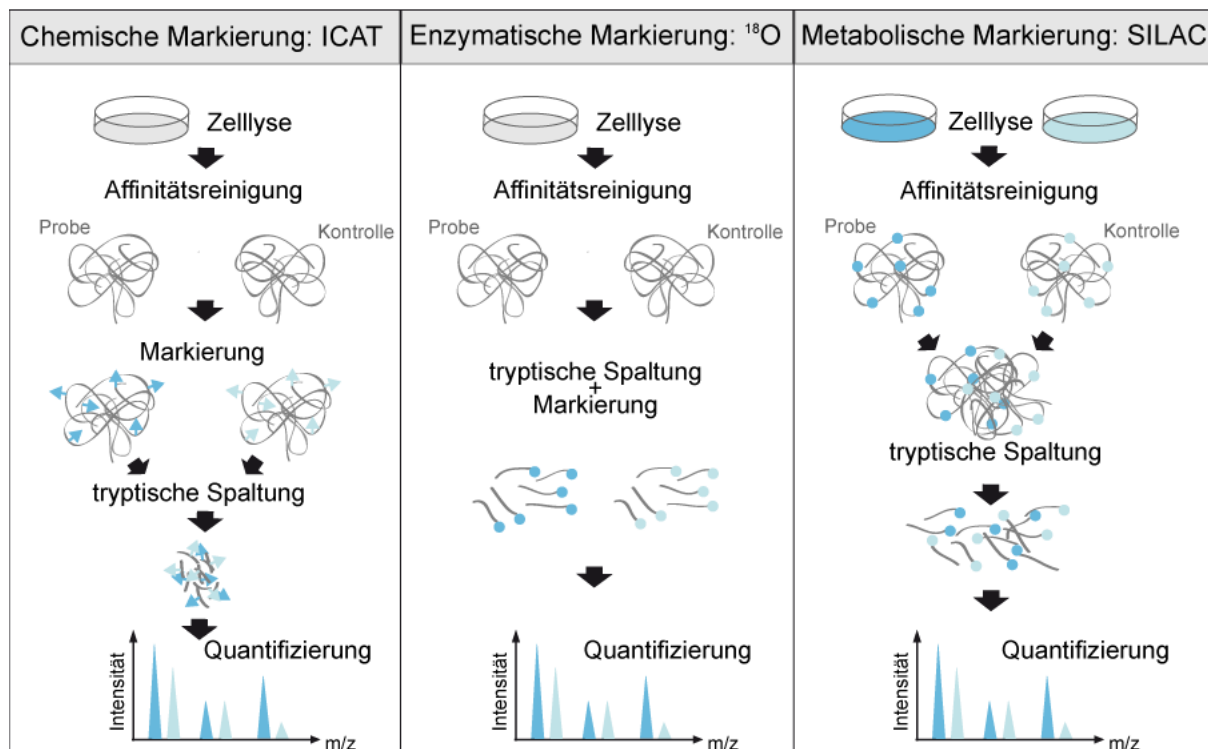


Abbildung 5: Alternative Methoden für die Markierung von Peptiden mit stabilen Isotopen.

1.4.4 Proteomische Analysen des *tight junction*-Komplexes

Obwohl bekannt ist, dass *tight junction*-Proteine für die Bildung intramembranöser Stränge sowie die Regulation der Barriereigenschaften und der parazellulären Permeation verantwortlich sind, reichen die bisherigen Kenntnisse der molekularen Komponenten der *tight junctions* nicht dazu aus, diese Prozesse im Detail zu beschreiben. Darüber hinaus geben die fortlaufenden Entdeckungen von Proteinen, die mit *tight junction*-Proteinen assoziiert sind, immer mehr Hinweise darauf, dass es sich bei den *tight junctions* nicht nur um eine Diffusionsbarriere handelt, sondern um einen multifunktionalen Komplex, der an der Steuerung komplexer Prozesse wie der Genexpression, Zelldifferenzierung und -proliferation sowie der Polarisation von Zellen beteiligt ist (Matter und Balda, 03). Nur durch eine umfangreiche molekulare Charakterisierung wird es möglich sein, die Funktion der *tight junctions* und die Prozesse, in die sie involviert sind, endgültig zu verstehen.

Funktionelle Proteomanalysen wurden bereits erfolgreich für die Entschlüsselung vielschichtiger Proteinkomplexe eingesetzt und dienen als Grundlage für die Anfertigung komplexer Protein-Interaktions-Netzwerke (Gavin et al., 02; Ho et al., 02). Bei den bisherigen Proteomanalysen, bei denen *tight junctions* eine Rolle spielten, wurden *tight-junction*-Proteine entweder durch Zufall als Interaktionspartner anderer Proteine identifiziert oder es standen vorwiegend die Gerüst- und regulatorischen Proteine der *tight junctions* im Fokus. Wang et al. reicherten mittels einer Immunpräzipitation Phosphotyrosinproteine aus einem

Zelllysate an (Wang et al., 06). Unter denen durch Massenspektrometrie identifizierten Proteinen war PAR-3, ein bereits bekanntes *tight junction*-assoziiertes Protein, das bei der Polarität von Epithelzellen eine Rolle spielt (1.2.2). Die Charakterisierung des Proteins zeigte, dass PAR-3 durch c-SRC und c-Yes am Tyr-1127 phosphoryliert wird. In einer weiteren Proteomanalyse wurde gezielt nach Interaktionspartnern des Tetraspanins CD9 gesucht und Claudin-1 identifiziert. Die anschließenden Verifizierungen bestätigten die Existenz eines CD9/Claudin-1-Heterodimers, das jedoch nicht in den *tight junctions* lokalisiert ist (Kovalenko et al., 07). Durch ein systematisches *screening* suchten Wells et al. nach Regulatoren der *tight junction*-assoziierten GTPase Cdc42 (Wells et al., 06). Dies führte zu der Identifizierung des GTPase-aktivierenden Proteins Rich1. Im Rahmen eines proteomischen Ansatzes, bei dem ein Flag-Rich1-Köderprotein eingesetzt wurde, um Interaktionspartner von Rich1 anzureichern, wurden durch die massenspektrometrische Analyse mit Vertretern der Angiomotin (Amot)-Familie, Pals1, PATJ und PAR-3 weitere Interaktionspartner von Rich1 identifiziert, die alle in der gleichen Region der *tight junctions* ko-lokalisieren. Infolge wechselseitiger Verifizierungen der Interaktionen wurde eine Verbindung der zwei *tight junction*-assoziierten Komplexe PAR-3/aPKC/PAR-6 und CRB3/Pals1/PATJ sowohl untereinander als auch zu den *tight junctions* gezeigt. Bei einer Proteomanalyse des PAR-3-Komplexes durch Brajenovic et al. wurden durch eine TAP-Affinitätsreinigung mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung sowohl bekannte Proteine des Komplexes als auch putative Interaktionspartner gefunden (Brajenovic et al., 04). Chen et al. verwendeten ein GST-Fusionsprotein der PDZ1-Domäne von ZO-1, um Interaktionspartner von ZO-1 anzureichern (Chen et al., 06). Durch Massenspektrometrie wurde eine Vielzahl von Gerüstproteinen identifiziert, von denen α -Actinin-4 als Interaktionspartner von ZO-1 verifiziert wurde. Mit dem *yeast-two-hybrid*-System identifizierten Tiwari-Woodruff et al. OAP-1 als neuen Interaktionspartner von Claudin-11 (Tiwari-Woodruff et al., 01). Eine Verallgemeinerung dieser Daten ist jedoch schwierig, da Claudin-11 ausschließlich in den Oligodendrocyten und in Schwann-Zellen exprimiert wird. Eine umfassende Proteomanalyse, mit dem Ziel möglichst viele Komponenten des *tight junction*-Komplexes anzureichern und zu charakterisieren, wurde von Tang durchgeführt (Tang, 06). Eine Klassifizierung der 912 identifizierten Proteine ergab, dass der größte Teil der angereicherten Proteine synaptische Proteine waren. Von den bereits bekannten Proteinen der *tight junctions* wurden bei diesem Ansatz ausschließlich Claudin-16, Cingulin, JAM-B und ZO-2 gefunden.

Zusammenfassend lässt sich einschätzen, dass bisher keine umfangreiche Proteomanalyse mit Fokus auf die Membranproteine des *tight junction*-Komplexes durchgeführt wurde.

1.5 Zielsetzung

Tight junctions sind wichtige Zell-Zell-Verbindungen in Epithelien, da sie durch die Ausbildung einer permeablen Diffusionsbarriere für die Homöostase verschiedener Kompartimente sorgen. Die genaue Kenntnis der molekularen Zusammenhänge des *tight junction*-Komplexes ist von großer pharmakologischer Bedeutung, da viele Krankheiten mit einer Dysfunktion der Barriere im Zusammenhang stehen. Ein detailliertes Verständnis der Zusammensetzung sowie der Signaltransduktionswege der *tight junctions* befindet sich erst in den Anfängen (Balda und Matter, 03).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur proteomischen Analyse des *tight junction*-Komplexes zu leisten. Der Schwerpunkt sollte dabei auf die Transmembranproteine der *tight junctions* gelegt werden, da diese das molekulare Rückgrat der *tight junctions* bilden. Die Interaktionen der Claudine gewährleisten die Funktionalität der intramembranal sowie parazellulären Diffusionsbarriere und sind damit von besonderer Bedeutung. Des Weiteren sollten im Rahmen eines Pilotversuches Interaktionspartner von Tricellulin identifiziert werden, da dieses *tight junction*-Protein erst kürzlich entdeckt wurde und über dessen Wechselwirkungen nicht viel bekannt ist.

Eine Vorfractionierung des Proteingemisches und eine Anreicherung der *tight junction*-Proteine sollte durch Affinitätsreinigungen erreicht werden. Claudine und Claudin-assoziierte Proteine sollten über ein GST-CPE-Fusionsprotein angereichert werden, das aus einem Abschnitt des rezeptorbindenden Bereichs des CPE (AS 116-319) konstruiert wurde. Die Anreicherung von Interaktionspartnern von Tricellulin sollte durch eine Affinitätsreinigung mit einem GST-Tricellulin-Fusionsprotein erreicht werden, das ausschließlich den C-Terminus von Tricellulin (AS 375-559) enthielt. Die Identifizierung und Analyse der durch die Affinitätsreinigungen gebundenen Proteine sollte durch massenspektrometrische Methoden erfolgen. Dabei sollte durch die Markierung der Proteine mit stabilen Isotopen (SILAC-Methode) eine quantitative Bewertung der gebundenen Proteine ermöglicht werden. Angereicherte Proteine sollten hinsichtlich einer möglichen physiologischen Relevanz für die Claudine bzw. Tricellulin diskutiert und ausgewählte potentielle Interaktionspartner durch geeignete Methoden verifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Elektroporator	EasyjecT prima	EquiBio/Thermo Electron, Milford, MA, USA
Flüssigchromatographiesystem Kapillarsäule	CapLC Atlantis dC ₁₈ , 3 µm, 100 Å, 150 mm x 75 mm i.d.	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Gradientengel-Gießer	Model 385	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Größenausschluss-Chromatographiesäule	Superdex 75 (S75)	GE Healthcare, München, Deutschland
HPLC: Pumpen Entgaser UV-Vis-Detector Steuerungseinheit	LC10-AS DGU-14A SPD-10A CBM-10A	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Isopropanol-Behälter	Nalgene TM Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene Labware, Rochester, NY, USA
Kryocontainer	5100 Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene Labware, Rochester, NY, USA
Laser-Scanning-Microscope	LSM 510 META-NLO	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikro-Dialysierkapsel	QuixSep, 1 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter	Phi 32	Beckmann Instruments Inc., Fullerton, CA, USA
Plattenleser	Tecan SAFIRE	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
Quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer	Q-TOF Ultima	Micromass, Manchester, Großbritannien
Rotator	Blood tube rotator SB1	Stuart Scientific, Stone Staffordshire, Großbritannien
Scanner	Mirage II	Umax Systems GmbH, Willich, Deutschland
SDS-Gelelektrophoresekammer	Mini Protean® II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
SDS-Gelelektrophoresekammer	Protean II xi 2-D Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
SDS-Gelelektrophoresekammer	Xcell Sure Lock™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Spannungsquelle	Pherostab 3033	Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland

Gerät	Modell	Hersteller
SpeedVac-Zentrifuge	ISS100	Sarvant Instruments, Farmingdale, NY, USA
Spektrophotometer	DU 640	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Sterilwerkbank	S-1200	BDK- Luft und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Taumler	Polymax2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Thermoschüttler	Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischkühlzentrifuge	5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transilluminator	Lumi-Imager F1 TM	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RK 52H	Bandelin electronic GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge	Sorvall [®] Evolution RC Rotor SS-34	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasserbad	GFL	Victor Recker, Berlin, Deutschland
Westernblot-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellinkubator	CB210	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zellzähler	CASY-1 (Cell counter and analyser system)	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge	PicoFuge TM	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Zentrifuge	Mini Spin Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Modell	Hersteller
Dialyseschlauch	Ultra Pure Dialysis Tubins; Exclusion limit 12-14 kDa	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier (Western Blot)	Extra dickes Filterpapier 15 x 20 cm, 30 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gewebekulturflasche	Corning [®] CellBind Surface 320	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Gewebekulturflasche	Cellstar	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Große Reinigungssäulen	Handee TM Centrifuge Columns, 5 ml	Perbio Science Deutschland, Bonn, Deutschland
Injektionskanülen	Gr. 17, 24Gx1"	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Konzentratoren	NanoSep 3K Omega	Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA

Material	Modell	Hersteller
Konzentratoren	Amicon Ultra-15 (5000 MWCO)	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Kryoröhrchen	2 ml, steril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotiterplatte	flacher Boden, unbeschichtet	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Milli-Q	-	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Parafilm® M	-	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Proteinmarker	SeeBlue® Plus2 Prestained Marker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Q-TOF Fläschen, Plättchen, Deckel	-	Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe, Deutschland
Spritzen	Injekt – F 1 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Transfermembran (Nitrozellulose)	Hybond™-P	GE Healthcare, München, Deutschland
Tris-Glycin Gele	Novex 4-20%	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturtestplatten	24 Vertiefungen	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Deutschland
Zentrifugationssäulchen	Mobicol	Mobitec GmbH, Göttingen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Molecular probes, Eugene, Oregon, USA
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Holland
Acetonitril (MeCN)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Acryl-/Bisacrylamid-Mix (30%/0,8%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Albumin aus Rinderserum (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumbicarbonat (ABC)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	VEB Laborchemie, Apolda, DDR
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Casyton®-Lösung	Innovatis AG, CASY® Technology, Reutlingen, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
CHAPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Coomassie TM Brilliant Blue G250	Fluka, Steinheim, Deutschland
Cytochalasin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Desoxycholsäure Natriumsalz (DOC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max [®] (steril filtriert)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ECL Western blotting detection reagents	GE Healthcare, München, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung (mind. 37%)	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gentamicin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glutathion- Sepharose 4B	GE Healthcare, München, Deutschland
Glutathion-Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Insulin/Transferrin/Selen A	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isopronanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Isopropyl-β-D-thiopyranosid (IPTG)	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Alanyl-L-Glutamine	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Arginin [¹² C]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Arginin [¹³ C]	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA
L-Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Liothyronine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lipidkonzentrat (chemisch definiert)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Lysin [¹² C]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Lysin [¹³ C]	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA
Magermilchpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MEM-nichtessentielle Aminosäuren	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MEM-Vitaminlösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Mounting-Lösung	Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA

Chemikalie	Hersteller
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Nonidet P40 (NP-40)	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Perchlorsäure	Fluka, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat (Tween 20)	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail für Bakterien	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail für Eukaryoten; Complete, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Rattenschwanzkollagen (hCMC/D3)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Rattenschwanzkollagen (NRC)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Rinderhypophysenextrakt	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SeeBlue® Plus2 Prestained Marker	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Triethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Trizma®-base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin – sequencing grade	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA (NRC)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsininhibitor (aus der Sojabohne)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Medien und Puffer für die Zellkultur

Medium/Puffer	Merkmale	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) F0415	3,7 g/l NaHCO ₃ 1 g/l D-Glucose ohne L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMEM/HAMS F12 (normal)	ohne L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM/HAMS F12 (SILAC)	ohne L-Glutamin ohne L-Arginin ohne L-Lysin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Medium/Puffer	Merkmale	Hersteller
EBM [®] -2	Endothelial Basal Medium-2	Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, Walkersville, MD, USA
EGM [®] -2 MV SingleQuots [®] BulletKit	FBS, Hydrocortione, hEGF, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, Ascorbic Acid, GA 1000	Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, Walkersville, MD, USA
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS-CM)	136,89 mM NaCl 2,68 mM KCl 6,47 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 0,90 mM CaCl ₂ 0,33 mM MgCl ₂	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphate buffer saline (PBS)	136,89 mM NaCl 2,68 mM KCl 6,47 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI medium 1640 (normal)	mit GlutaMAX [™] I.	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI medium 1640 (SILAC)	ohne L-Arginin ohne L-Lysin	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Deutschland

2.1.5 Kits

Kit	Hersteller
2-D Quant Kit	GE Healthcare, München, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper				
Antikörper	Spezies	WB ¹	IF ²	Firma
Anti-Claudin-1	Kaninchen	1:2000	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Claudin-3	Kaninchen	1:2000	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Claudin-4	Maus	1:2000	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Claudin-5	Kaninchen	1:2000	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Claudin-7	Kaninchen	1:250	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-ZO-1	Maus	1:2000	-	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-JAM-A	Kaninchen	1:1000	-	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-SUMO-1	Kaninchen	1:1500	1:120	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-SphK2	Ziege	1:200	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti-Integrin- α 3	Ziege	1:200	-	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland

¹ WB: Western Blot

² IF: immunfluoreszenz

Sekundäre Antikörper				
Antikörper	Spezies	WB	IF	Firma
Anti-Maus HRP-Konjugat	Ziege	1:5000	-	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Kaninchen HRP-Konjugat	Ziege	1:5000	-	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Ziege HRP-Konjugat	Esel	1:10000	-	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk Großbritannien
Anti-Maus Cy3-Konjugat	Ziege	-	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Maus Alexa Fluor488-Konjugat	Ziege	-	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Kaninchen Cy3-Konjugat	Ziege	-	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Kaninchen Alexa Fluor488-Konjugat	Ziege	-	1:250	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Ziege Cy3-Konjugat	Esel	-	1:600	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Kaninchen Cy5-Konjugat	Esel	-	1:600	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.7 Plasmide

Plasmid	Merkmal	Referenz
pLW16	CPE ₁₁₆₋₃₁₉ im pGEX-4T1-Vektor	Dr. Lars Winkler, FMP, Berlin
pGEX-4T1	4,9 kb; Amp ^r ; pBR322 ori; P _{tac} ; <i>lacI</i> ^q ; Glutathione S-Transferase (GST), N-terminal	GE Healthcare, München, Deutschland

2.1.8 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Eigenschaft	Verwendungszweck
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B - m _B -) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind sam7 nin5</i>])	Proteinexpression

2.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Bezeichnung	Referenz
Human colon carcinoma cells	Caco-2	(Vincent et al., 85)
Normal rat cholangiocyte cells	NRC	(Weksler et al., 05)
hCMEC/D3 human brain endothelial cells	hCMEC/D3	(Vroman und LaRusso, 96) (Salter et al., 00)
Human colon carcinoma cell line HT29 B/6	HT29 B/6	(Thomas et al., 74)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 GST-Konstrukt mit *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE)

Die cDNA des CPE-Gens wurde von Dr. Horiguchi (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Synthese des N-terminalen GST-Fusionsproteins (GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉) wurde von Dr. Lars Winkler (FMP, Berlin) durchgeführt. Dafür wurde das den AS 116-319 entsprechende Fragment des CPE-Gens (348-967) durch PCR amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T1 kloniert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pLW16 (2.1.7).

2.2.2 Transformation von Bakterien

Die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Bakterien erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook (Sambrook et al., 89). Die Bakterien wurden auf Eis vorsichtig aufgetaut. Zu je 50 µl elektrokompenten *E. coli* BL21-Bakterien wurde 1 µl pLW16 oder 0,5 µl pGEX-4T1 gegeben. Die Transformation der Plasmide in die *E. coli* BL21-Bakterien erfolgte durch Elektroporation, die nach den Angaben des Herstellers des Elektroporators (2.1.1) durchgeführt wurde. Nach der Transformation wurden die Bakterien in 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium (Tabelle 2) aufgenommen und eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten (Tabelle 2), die mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt waren, ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Tabelle 2: Medien für die Transformation von Bakterien.

Medien	Zusammensetzung
SOC-Medium (pH 7,0; mit NaOH)	10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂ 0,05 % (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Pepton aus Casein in dest. Wasser; 20 Minuten bei 121°C autoklaviert steril 20 mM Glukose dazugeben
LB-Medium (Luria-Bertani, Vollmedium)	1% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Pepton aus Casein in dest. Wasser; 20 Minuten bei 121°C autoklaviert
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar-Agar versetzt

2.2.3 Lagerung von *E. coli*-Bakterien in Glycerin

Für die permanente Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurde 1 ml der über Nacht-Kultur mit 400 µl 87%igem Glycerin durchmischt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Expression und Reinigung der GST-Proteine

Für die Expression von GST und dem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsprotein wurde mit einer Pipettenspitze Material von den *E. coli* BL21-Glycerinkulturen (2.2.3) entnommen, in 10 ml LB-Medium (Tabelle 2) mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln (240 rpm) kultiviert. Am nächsten Tag wurden 4 ml dieser über Nacht-Kultur in 800 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben und bei 37°C unter ständigem Schütteln (240 rpm) weiterkultiviert. Nachdem eine optische Dichte (OD)_{600nm} von 0,6-0,8 erreicht wurde, wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert, und die Kultur für weitere drei Stunden bei 240 rpm geschüttelt, wobei die Temperatur auf 30°C gesenkt wurde. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3000 x g, 10 Minuten, 4°C) pelletiert. Die Bakterienpellets wurden in 20 ml kaltem Bakterien-Lysepuffer (Tabelle 3) aufgenommen und sorgfältig resuspendiert.

Tabelle 3: Puffer für die GST-Proteinreinigung.

Puffer	Zusammensetzung
Bakterien-Lysepuffer	1% (v/v) Triton X-100 0,1 mM PMSF 1 mM EDTA 0,2 mM Proteaseinhibitoren für Bakterien 5 mM DTT in PBS
Agarose-Waschpuffer	1% (v/v) Triton X-100 5 mM DTT 1 M NaCl in PBS
Agarose-Elutionspuffer	20 mM reduziertes Glutathion 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 120 mM NaCl 5 mM DTT in dest. Wasser

Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch zwei bis drei Passagen in einem EmulsiFlex-C3 Homogenisator (2.1.1). Das Lysat wurde zentrifugiert (30000 x g, 1 Stunde, 4°C) und zum

Überstand Triton X-100 (1%), PMSF (0,1 mM), EDTA (1 mM) und prokaryotischen Proteaseinhibitoren (0,2 mM) gegeben. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben, die vorher mit 4 ml Glutathion-Agarose beladen wurde. Vor der Elution wurde die Agarose dreimal mit Agarose-Waschpuffer (Tabelle 3) gewaschen. Die an die Glutathion-Agarose gebundenen Proteine wurden mit jeweils 1 ml Agarose-Elutionspuffer (Tabelle 3) in 15 Einzelfractionen eluiert. Gegebenenfalls wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und auf 1 ml (2,5 µg/µl) konzentriert. Die Proteinproben wurden kurzfristig (< 1 Woche) bei 0°C gelagert.

2.3.2 Dialyse

Die Proteinproben wurden durch Dialyse gegen PBS umgepuffert. Für die Dialyse wurde eine Mikro-Dialysierkapsel (1 ml) sowie ein Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen 12-14 kDA verwendet (2.1.2). Die Proteinprobe wurde bei 4°C unter ständigem Rühren einschließlich eines Pufferwechsels in je 500 ml PBS für zwei Stunden und über Nacht dialysiert.

2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mit dem 2-D Quant-Kit von GE Healthcare (2.1.5) nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Die Proben wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben und deren Absorption in einem Plattenleser (2.1.1) bei einer Wellenlänge von 480 nm gemessen.

2.3.4 Acetonfällung

Zum Fällern von Proteinen wurde zu den Proteinproben das vierfache Volumen an eiskaltem Aceton gegeben (Endkonzentration von 80%). Die Proben wurden über Nacht in ein Eisbad gestellt und anschließend zentrifugiert (30 Minuten, 20000 x g, 4°C). Die Überstände wurden verworfen und die Proteinpräzipitate in 1x SDS-Probenpuffer (Tabelle 4) aufgenommen.

2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Polyacrylamidgele und Elektrophoresepuffer wurden nach dem Standardprotokoll von Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook et al., 89).

2.3.5.1 Probenvorbereitung

Zu den Proteinproben wurde 5x-SDS-Probenpuffer (Tabelle 4) im Volumenverhältnis 4:1 gegeben. Nach fünfminütigem Erhitzen bei 40°C bzw. 95°C wurden die Proben auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Laufpuffer diente einfach konzentrierter SDS-Elektrophoresepuffer (Tabelle 4). Als Größenstandard wurde der *SeeBlue®Plus2 Prestained Marker* von Invitrogen (2.1.2) verwendet.

Die Auftrennung der denaturierten Proteine nach ihrer molekularen Masse erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung verschiedener Gelelektrophorese-Systeme

Tabelle 4: Puffer für die SDS-PAGE.

Puffer	Zusammensetzung
5x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris/HCl (pH 6,8) 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerol 0,005 % (w/v) Bromphenolblau 500 mM DTT in dest. Wasser
1x SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS in dest. Wasser

2.3.5.2 Mini Protean® II

Für die Western Blots und die Optimierungen der Affinitätsreinigung wurden die Gelelektrophoresen in der Mini Protean® II-Kammer (2.1.1) durchgeführt. Im Hinblick auf die Western Blots wurde die Acrylamidkonzentration der Trenngele entsprechend des Molekulargewichts des zu analysierenden Proteins gewählt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Auftrennungsbereiche von Polyacrylamidgelen.

Prozentsatz Acrylamid	Molekulargewicht
15%	10 – 60 kDa
10%	30 – 120 kDa
6%	50 – 200 kDa

In Tabelle 6 sind die Zusammensetzungen der Gellösungen für jeweils ein Gel (Minigel (Größe 5,2 cm x 8,3 cm), 1 mm Spacer) aufgeführt.

Der Gellauf wurde zunächst bei einer Stromstärke von 15 mA- pro Gel für 20 Minuten gestartet. Die Stromstärke wurde dann auf 30 mA- pro Gel erhöht.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Gellösungen für die SDS-PAGE (Mini Protean® II).

Stammlösung	Trenngel 15%	Trenngel 10%	Trenngel 6%	Sammelgel 4%
30% Acrylamid	1,70 ml	2,95 ml	3,95 ml	1,40 ml
dest. Wasser	3,75 ml	2,50 ml	1,50 ml	330 µl
1,5 M Tris (pH 8,5) (Trenngel) 1 M Tris (pH 6,8) (Sammelgel)	3,80 ml	1,90 ml	1,90 ml	250 µl
10% (w/v) SDS	75 µl	75 µl	75 µl	20 µl
TEMED	75 µl	75 µl	75 µl	20 µl
10% (w/v) APS	3 µl	3 µl	6 µl	2 µl

2.3.5.3 Xcell Sure Lock™

Von der Firma Invitrogen wurden Tris-Glycin-Gradientengele (Novex 4-20%) nach Herstellerangaben und die Xcell Sure Lock™-Elektrophoresekommer (2.1.1) verwendet. Die Laufzeit der Gele betrug ca. 90 Minuten bei 125 V-.

2.3.5.4 Protean II xi 2-D Gel

Für die Proteom-Analysen mit anschließender Identifizierung der Proteine durch Massenspektrometrie wurde das Gelelektrophorese-System Protean II xi 2-D Gel (2.1.1) verwendet. Dazu wurden 4-18%ige Gradientengele der Größe 16 cm x 20 cm (1,5 mm Spacer) mit einem Gradientengelgießer (2.1.1) gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Die Gele wurden über Nacht bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Am nächsten Tag wurde das Sammelgel mit einer Acrylamid-Konzentration von 4% gegossen. In Tabelle 7 sind die Zusammensetzungen der Gellösungen aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gellösungen für ein 4-18%iges Gradientengel.

Stammlösung	Trenngel 4%	Trenngel 18%	Sammelgel 4%
30% (v/v) Acrylamid	3,30 ml	12 ml	1,30 ml
dest. Wasser	9,90 ml	2,60 ml	7,20 ml
1,5 M Tris (pH 8,5) (Trenngel) 1 M Tris (pH 6,8) (Sammelgel)	6,30 ml	5,00 ml	1,25 ml
10% (w/v) SDS	250 µl	200 µl	100 µl
TEMED	250 µl	200 µl	100 µl
10% (w/v) APS	20 µl	16 µl	10 µl

Der Gellauf von einem Gel wurde bei einer Stromstärke von 10 mA- gestartet. Nach 15 Minuten wurde die Stromstärke auf 25 mA- erhöht und nach weiteren 30 Minuten auf 40 mA- eingestellt.

2.3.6 Fixierung und Färbung der Polyacrylamidgele

2.3.6.1 Coomassie-Färbung 1

Für ein schnelles Färben wurden die Gele direkt nach der Elektrophorese für ca. 10 Minuten in Coomassie-Färbelösung 1 (Tabelle 8) geschwenkt und danach in Wasser durch mehrfaches Erhitzen von jeweils fünf Minuten in der Mikrowelle entfärbt.

Tabelle 8: Lösung für die Coomassie-Färbung 1.

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung 1	0,04% (w/v) Coomassie G-250 3,4% (v/v) Perchlorsäure (96%) 3,5% (v/v) Ethanol (100%) in dest. Wasser

2.3.6.2 Coomassie-Färbung 2

Für die Proteom-Analysen mit anschließender Identifizierung der Proteine durch Massenspektrometrie wurden die Gele nach der Elektrophorese für mindestens eine Stunde in Fixierlösung (Tabelle 9) gegeben und anschließend über Nacht in Coomassie-Färbelösung 2 (Tabelle 9) gefärbt. Danach wurden die Gele bis zum vollständigen Entfärben des Hintergrunds in Entfärbelösung (Tabelle 9) geschwenkt.

Tabelle 9: Lösungen für die Coomassie-Färbung 2.

Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure in dest. Wasser
Coomassie-Färbelösung II	17% (w/v) Ammoniumsulfat 3% (v/v) Phosphorsäure (85%) 34% (v/v) Methanol 0,1% (w/v) Coomassie G-250 in dest. Wasser
Entfärbelösung	1% (v/v) Essigsäure in dest. Wasser

2.3.6.3 Silberfärbung

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele für mindestens 30 Minuten in Fixierlösung (Tabelle 10) geschwenkt. Anschließend wurden die Gele einmal 10 Minuten in 50% Ethanol sowie zweimal je 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Nachdem die Gele für mindestens 5 Minuten in 0,02% Natriumthiosulfat geschwenkt wurden, wurden sie zweimal je 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Die Gele wurden dann mindestens 30 Minuten in 0,1%iger Silbernitratlösung inkubiert und anschließend kurz (10 Sekunden) mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde zu den Gelen Entwickler (Tabelle 10)

gegeben, der nach 5-10 Sekunden wieder verworfen wurde. Danach wurde das Gel so lange in Entwickler geschwenkt, bis die Proteinbanden gut zu sehen waren. Der Entwickler wurde sofort verworfen und die Stop-Lösung (Tabelle 10) auf das Gel gegeben. Nach weiteren fünf Minuten wurde die Stop-Lösung gegen 1%ige Essigsäure ausgetauscht, in der die Gele aufbewahrt wurden.

Tabelle 10: Lösungen für die Silberfärbung.

Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	50% Ethanol 5% Essigsäure in dest. Wasser
Entwickler	0,04% Formaldehyd 2% Natriumcarbonat in dest. Wasser
Stop-Lösung	5% Essigsäure in dest. Wasser

2.3.7 Western Blot

Um Proteine spezifisch nachzuweisen, wurden die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer Semi-Dry Transferzelle vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin et al., 79). Dazu wurden das Gel und die Membran, nachdem diese mit destilliertem Wasser angefeuchtet wurde, zunächst 10 Minuten in Transferpuffer (Tabelle 11) equilibriert. Zur Durchführung des Western Blots wurde ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier auf die Anode der Blot-Apparatur gelegt. Auf dieses Filterpapier wurden die Membran, dann das Gel und abschließend wieder ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Spannung von 20 V für mindestens 45 Minuten. Zur Überprüfung der Effektivität des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Färbelösung (Tabelle 11) angefärbt. Durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Membran anschließend wieder entfärbt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer-WB (Tabelle 11) geschwenkt. Nachdem die Membran dreimal je 10 Minuten in TBST-Puffer (Tabelle 11) gewaschen wurde, wurde der primäre Antikörper den Herstellerangaben entsprechend (2.1.6) in TBST-Puffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Nachdem die Membran dreimal je 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen wurde, erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur, der nach Herstellerangaben (2.1.6) in TBST-Puffer verdünnt wurde. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal je 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen. Zu der Membran wurde *ECL Western blotting detection reagents* (2.1.2) gegeben und der

Western Blot mit dem Lumi-Imager F1TM (2.1.1) analysiert. Eine Quantifizierung der Signale erfolgte durch die Ermittlung von *Boehringer light units* (BLU).

Um auf der Membran ein weiteres Antigen nachweisen zu können, wurde die Membran zum Entfernen der Detektierlösung dreimal kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Zum Entfernen der Antikörper wurde die Membran 30 Minuten bei 50°C in *Strip*-Puffer (Tabelle 11) inkubiert. Nachdem die Membran zweimal kurz in destilliertem Wasser gewaschen wurde, wurde sie zweimal je 10 Minuten in einem großen Volumen TBST-Puffer geschwenkt. Dann wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer-WB geschwenkt und danach dreimal jeweils 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen. Um ein vollständiges Entfernen des primären Antikörpers zu überprüfen, wurde die Membran erneut eine Stunde bei RT mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert, dreimal je 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und mit dem Lumi-Imager analysiert. Nachdem sichergestellt werden konnte, dass der vorherige primäre Antikörper vollständig entfernt wurde, erfolgte die Inkubation und Detektion des nächsten primären Antikörpers wie bereits oben beschrieben.

Tabelle 11: Lösungen für den Western Blot.

Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	192 mM Glycin 20% Methanol 0,1% (w/v) SDS 25 mM Tris-base in dest. Wasser
TBST-Puffer	150 mM NaCl 20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 0,05% Tween-20 in dest. Wasser
Blockierungspuffer-WB	3% (w/v) Trockenmilchpulver in TBST
Ponceau S-Färbelösung	1% Essigsäure 0,02% (w/v) Ponceau S in dest. Wasser
<i>Strip</i> -Puffer	100 mM 2-Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7) in dest. Wasser

2.3.8 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie wurde als zusätzlicher Reinigungsschritt nach der Reinigung des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ durchgeführt, um den Reinheitsgrad des Fusionsproteins zu erhöhen. Die Elutionsfraktionen einer GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Reinigung (2.3.1) wurden mit Amicon Ultra-15-Konzentratoren (5000 MWCO) auf 500 µl konzentriert (5 µg/µl). Die Superdex 75-Säule (2.1.1) wurde an ein Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC)-System

(2.1.1) angeschlossen und mit filtriertem PBS-Puffer equilibriert. Von der konzentrierten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Probe wurden 100 µl auf die Säule gegeben. Die Proteine wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgetrennt. Dabei erfolgte eine Aufzeichnung der UV-Absorption der Eluate bei 280 nm bzw. 216 nm (A_{280} bzw. A_{216}) gegenüber der Zeit in einem Chromatogramm. Die jeweils einem Absorptionsmaximum entsprechenden 1 ml Elutionsfraktionen wurden aufgefangen, kombiniert und eine Acetonfällung (2.3.4) durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend durch eine SDS-PAGE (2.3.5) analysiert.

2.3.9 GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung für die Anreicherung von Claudinen und deren Interaktionspartnern

2.3.9.1 Affinitätsreinigung mit dem *E. coli*-Rohextrakt der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Expression

Die Expression der GST-Fusionsproteine und die Herstellung des *E. coli*-Rohextrakts wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Von der Glutathion-Sepharose-4B Suspension wurden je 60 µl entnommen, zentrifugiert (300 x g, 1 Minute, 4°C) und mit 600 µl kaltem PBS-Puffer gewaschen. Das Säulenmaterial wurde mit je 800 µl *E. coli*-Rohextrakt aus der Expression von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bzw. GST als Kontrolle eine Stunde bei 4°C im Rotator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 600 µl Sepharose-Waschpuffer 1 (Tabelle 12) wurde zur protein-beladenen Sepharose eukaryotisches Zelllysatsat (2.4.8), das einer Proteinmenge von 1,5 mg entsprach, gegeben und für 2 Stunden bei 4°C im Rotator inkubiert. Der ungebundene Lysatüberstand wurde anschließend abgenommen und als Durchflussfraktion behalten. Die Sepharose wurde zweimal mit Sepharose-Waschpuffer 2 (Tabelle 12) und einmal mit Sepharose-Waschpuffer 3 (Tabelle 12) gewaschen. Zum Eluieren der Proteine wurde die Sepharose zweimal 10 Minuten in je 75 µl Sepharose-Elutionspuffer (Tabelle 12) inkubiert. Die beiden Elutionsfraktionen wurden vereinigt, sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.3.9.2 Affinitätsreinigung mit dem gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉

Die Expression und Reinigung der GST-Proteine wurde wie unter 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Für die Western Blots und die Optimierungen der Affinitätsreinigung wurden von der Glutathion-Sepharose-4B Suspension je 60 µl entnommen, zentrifugiert (300 x g, 1 Minute, 4°C) und mit 600 µl kaltem PBS-Puffer gewaschen. Die Sepharose wurde mit je 80 µg GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bzw. GST als Kontrolle beladen und eine Stunde bei 4°C im Rotator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 600 µl Sepharose-Waschpuffer 1 (Tabelle 12) wurde zur protein-beladenen Sepharose eukaryotisches Zelllysatsat (2.4.8) gegeben, das einer

Proteinmenge von 1,5 mg entsprach, und für 2 Stunden bei 4°C im Rotator inkubiert. Der ungebundene Lysatüberstand wurde anschließend abgenommen und als Durchflussfraktion behalten. Die Sepharose wurde zweimal mit Sepharose-Waschpuffer 2 (Tabelle 12) und einmal mit Waschpuffer 3 (Tabelle 12) gewaschen. Zum Eluieren der Proteine wurde die Sepharose zweimal 10 Minuten in je 75 µl Sepharose-Elutionspuffer (Tabelle 12) inkubiert. Die beiden Elutionsfraktionen wurden vereinigt, sofort verwendet oder gegebenenfalls bei -20°C gelagert.

Für die Proteom-Analyse wurden von der Glutathion-Sepharose-4B Suspension je 500 µl entnommen, zentrifugiert (300 x g, 1 Minute, 4°C) und mit 4 ml kaltem PBS-Puffer gewaschen. Die Sepharose wurde mit je 800 µg GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bzw. GST als Kontrolle beladen und eine Stunde bei 4°C im Rotator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4 ml Sepharose-Waschpuffer 1 (Tabelle 12) wurde zur Protein-beladenen Sepharose eukaryotisches Zelllysate (2.4.8) einer Proteinmenge von 15 mg gegeben. Die Inkubation wurde für 2 Stunden bei 4°C im Rotator durchgeführt. Im Hinblick auf eine Quantifizierung der durch die Affinitätsreinigung angereicherten Proteine durch die SILAC-Methode wurden Lysate von Zellen verwendet, die in Anwesenheit von unmarkierten [¹²C]-Aminosäuren oder den entsprechenden isotope markierten [¹³C]-Aminosäuren kultiviert wurden (2.4.5). Die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-beladene Sepharose wurde mit dem Lysat der in Anwesenheit von isotope markierten [¹³C]-Aminosäuren kultivierten Zellen inkubiert während die GST-beladene Sepharose mit dem Lysat der in Gegenwart von unmarkierten [¹²C]-Aminosäuren kultivierten Zellen inkubiert wurde. Das reverse Experiment wurde ebenfalls durchgeführt. Die Sepharose wurde zweimal mit Sepharose-Waschpuffer 2 (Tabelle 12) und einmal mit Sepharose-Waschpuffer 3 (Tabelle 12) gewaschen. Mit dem letzten Waschpuffer wurde die Sepharose vor der Elution in eine neue Säule überführt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren.

Tabelle 12: Puffer für die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung.

Puffer	Zusammensetzung
Sepharose-Waschpuffer 1	1% (v/v) Triton X-100 5 mM DTT in PBS
Sepharose-Waschpuffer 2	1% (v/v) Triton X-100 0,5 mM DTT in PBS
Sepharose-Waschpuffer 3	0,1% (v/v) Triton X-100 0,5 mM DTT in PBS
Sepharose-Elutionspuffer	20 mM reduziertes Glutathion 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 120 mM NaCl 0,5 mM DTT in dest. Wasser

Zum Eluieren der Proteine wurde die Sepharose dreimal 10 Minuten mit je 500 µl Sepharose-Elutionspuffer (Tabelle 12) inkubiert. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend vereinigt, mit NanoSep 3K Omega-Konzentratoren auf 35 µl konzentriert und im Verhältnis von 1:1 kombiniert. Zu den kombinierten Proben wurde 5x-SDS-Probenpuffer gegeben. Die Probe wurde mittels eines 4-18%igen Gradientengels elektrophoretisch aufgetrennt (2.3.5.4).

2.3.9.3 Affinitätsreinigung nach Zellinkubation mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉

Für die Inkubation von NRC-Zellen mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ vor der Zelllyse wurden die Zellen je einer 75 cm²-Gewebekulturflasche mit 2 ml Trypsin abgelöst (2.4.2) und in 10 ml Medium resuspendiert, das im Gegensatz zum NRC-Standardmedium 10% FCS enthielt, um das Trypsin wieder zu deaktivieren. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (300 x g, 5 Min, RT) sedimentiert, das Pellet in 1 ml NRC-Standardmedium resuspendiert und zu dieser Zellsuspension gereinigtes GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (2.3.1) gegeben. Die Zellen wurden mit 100 µg GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bei 4°C oder 37°C für 30 Minuten inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen bei 4°C mit dem bloßen GST-Affinitätspepitop inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (500 g, 5 Minuten, 4°C), die Überstände verworfen und die Zellpellets zum Waschen in 1 ml PBS resuspendiert. Nachdem die Zellen erneut zentrifugiert (500 x g, 5 Minuten, 4°C) wurden, erfolgte die Zelllyse wie unter 2.4.8 beschrieben. 60 µl Glutathion-Sepharose-4B Suspension wurde mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Zu der Sepharose wurde eukaryotisches Zelllysats gegeben, das einer Proteinmenge von 1,5 mg entsprach und 1 Stunde bei 4°C im Rotator inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit Sepharose-Waschpuffer 2 (Tabelle 12) und einem mit Sepharose-Waschpuffer 3 (Tabelle 12) wurde die Sepharose zweimal 10 Minuten mit je 75 µl Sepharose-Elutionspuffer (Tabelle 12) inkubiert. Die beiden Elutionsfraktionen wurden vereinigt, sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.3.10 GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung für die Anreicherung von Interaktionspartnern von Tricellulin

Das GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Fusionsprotein wurde von Prof. Dr. Huber (Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt. Für die Kontrolle wurde das GST-Protein wie unter 2.3.1 beschrieben exprimiert und gereinigt. Von der Glutathion-Sepharose-4B Originallösung wurden je 250 µl entnommen, abzentrifugiert (300 x g, 1 Minute, 4°C) und mit 2 ml kalter PBS gewaschen. Die Sepharose wurde mit je 50 µg GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉ bzw. GST als Kontrolle beladen und eine Stunde bei 4°C im Rotator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 2 ml Sepharose-Waschpuffer 1 (Tabelle 12) wurde zur proteinbeladenen Sepharose eukaryotisches Zelllysats (2.4.8) gegeben. Im Hinblick auf eine Quantifizierung der durch die Affinitätsreinigung

angereicherten Proteine durch die SILAC-Methode wurde die GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-beladene Sepharose mit dem Lysat von Zellen, die in Anwesenheit von isotopenmarkierten [¹³C]-Aminosäuren und die GST-beladene Sepharose mit dem Lysat von Zellen, die in Anwesenheit von unmarkierten [¹²C]-Aminosäuren kultiviert wurden, inkubiert. Es wurden bei beiden Ansätzen 1,5 ml Zelllysate eingesetzt, was jeweils einer Proteinmenge von ca. 15 mg entsprach. Die Inkubation wurde für 2 Stunden im Rotator bei 4°C durchgeführt. Die Sepharose wurde zweimal mit Sepharose-Waschpuffer 2 (Tabelle 12) und einmal mit Sepharose-Waschpuffer 3 (Tabelle 12) gewaschen. Mit dem letzten Waschpuffer wurde die Sepharose vor dem Eluieren in eine neue Säule überführt. Zum Eluieren der Proteine wurde die Sepharose dann zweimal 10 Minuten mit je 200 µl Sepharose-Elutionspuffer (Tabelle 12) inkubiert. Alle Elutionsfraktionen wurden anschließend vereinigt und auf ca. 50 µl konzentriert. Zu 40 µl der kombinierten Proben wurde 5x-SDS-Probenpuffer gegeben, und die Probe wurde mittels eines 4-20%igem Tris-Glycin-Gradientengels elektrophoretisch aufgetrennt (2.3.5.3).

2.3.11 Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation wurde ausschließlich mit dem Sphingosinkinase 2-Antikörper (2.1.6) durchgeführt. Es wurden 50 µl Zelllysate (2.4.8), das entspricht in etwa 500 µg Protein, mit 2 µg Sphingosinkinase 2-Antikörper gemischt und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Protein A/G PLUS-Agarose dazugegeben. Als Kontrolle wurden in einem weiteren Ansatz 50 µl Lysat mit 10 µl Protein A/G PLUS-Agarose gemischt. Beide Ansätze wurden 1 Stunde bei 4°C im Rotator inkubiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (300 x g, 1 Minute, 4°C) und der ungebundene Lysatüberstand als Durchflussfraktion behalten. Die Agarose wurde zweimal mit IP-Waschpuffer 1 (Tabelle 13) und einmal mit IP-Waschpuffer 2 (Tabelle 13) gewaschen. Zu der Agarose wurden 20 µl 1x-SDS-Probenpuffer (Tabelle 4) gegeben und die Proben 5 Minuten bei 40°C erwärmt.

Tabelle 13: Puffer für die Immunpräzipitation.

Puffer	Zusammensetzung
IP-Waschpuffer 1	1% (v/v) Triton X-100 in PBS
IP-Waschpuffer 2	0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen wurden in 75 cm²-Gewebekulturflaschen (Corning) in Caco-2-Standardmedium (Tabelle 14) bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden konfluente Zellen einmal mit PBS-Puffer gespült und durch fünf- bis zehnminütige Inkubation mit 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Tabelle 14) bei 37°C von der Gewebekulturflasche abgelöst.

Tabelle 14: Kulturbestandteile für Caco-2-Zellen.

Medium/Lösung	Zusammensetzung
Caco-2-Standardmedium	DMEM F0415 10% (v/v) FCS 200 mM L-Alanyl-L-Glutamine 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% (v/v)/0,02% (w/v) in PBS

Die abgelösten Zellen wurden in 8,5 ml Caco-2-Standardmedium aufgenommen und mit einer Pasteurpipette vorsichtig resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 3,3 ml in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit 10 ml Caco-2-Standardmedium aufgefüllt. Durch Schwenken wurden die Zellen in der Gewebekulturflasche gleichmäßig verteilt.

2.4.2 Kultivierung von NRC-Zellen

Für die Kultivierung von NRC-Zellen wurden 75 cm²-Gewebekulturflaschen (Greiner) mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Von der NRC-Rattenschwanzkollagen-Lösung (Tabelle 15) wurden je 40 µl in eine 75 cm²-Gewebekulturflasche gegeben, sorgfältig mit einem Zellschaber verteilt und an der Luft getrocknet.

Die Zellen wurden in NRC-Standardmedium (Tabelle 15) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS-Puffer gespült und in 8 ml PBS für zwei Minuten bei 37°C auf der Wärmeplatte inkubiert. Nach dem Absaugen des PBS-Puffers wurden die Zellen in 2 ml Trypsin (NRC) 15 Minuten auf der Wärmeplatte bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 4 ml NRC-Standardmedium vorsichtig resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 2 ml in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit 8 ml NRC-Standardmedium aufgefüllt. Durch Schwenken wurden die Zellen in der Gewebekulturflasche gleichmäßig verteilt.

Tabelle 15: Kulturbedingteile für NRC-Zellen.

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Lösungsmittel
NRC-Rattenschwanzkollagen-Lösung	10 mg/15 ml Rattenschwanzkollagen (NRC) über Nacht quellen lassen	0,2%ige sterile Essigsäure
NRC-Standardmedium	DMEM/HAMS F12	
	5% (v/v) FCS	
	100 µM MEM-nichtessentielle Aminosäuren	
	1% (v/v) Insulin/Transferrin/Selen A	
	1% (v/v) Lipidkonzentrat (chemisch definiert)	
	1% (v/v) MEM-Vitaminlösung	
	50 µg/ml Trypsininhibitor (Sojabohne)	PBS
	2 mM Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	
	20 µg/ml Gentamicin	
	30 µg/ml Rinderhypophysenextrakt	
	393 ng/ml Dexamethason	Ethanol
	3,4 µg/ml Liothyronin	Ethanol
	25 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor	Medium/0,1% BSA
	4,1 µg/ml Forskolin	DMSO

2.4.3 Kultivierung von hCMEC/D3-Zellen

Für die Kultivierung von hCMEC/D3-Zellen wurden 75 cm²-Gewebekulturflaschen (Greiner) mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Von der hCMEC/D3-Rattenschwanzkollagen-Lösung (Tabelle 16) wurden je 40 µl in eine 75 cm²-Gewebekulturflasche gegeben, sorgfältig mit einem Zellschaber verteilt und an der Luft getrocknet.

Tabelle 16: Kulturbedingteile für hCMEC/D3-Zellen.

Medium/Lösung	Zusammensetzung
hCMEC/D3-Rattenschwanzkollagen-Lösung	100 µg/ml Rattenschwanzkollagen (hCMEC/D3) in dest. Wasser
hCMEC/D3-Standardmedium (Zusätze aus dem EGM2- Bullet Kit)	EBM [®] -2, Endothelial Basal Medium-2 2,5% (v/v) FBS 0,01% (v/v) Hydrocortisone 0,1% (v/v) hFGF-B 0,025% (v/v) VEGF 0,025% (v/v) R ³ -IGF-1 0,025% (v/v) Ascorbic acid 0,025% (v/v) hGEF 0,025% (v/v) GA-1000
Trypsin/EDTA – Lösung	0,05% (v/v)/0,02% (w/v) in PBS

Die Zellen wurden in hCMEC/D3-Standardmedium (Tabelle 16) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden konfluente Zellen einmal mit PBS-Puffer gespült und durch drei- bis fünfminütige Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Tabelle 16) bei 37°C

von der Gewebekulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 8 ml hCMEC/D3-Standardmedium aufgenommen und mit einer Pasteurpipette vorsichtig resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 2 ml in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit 10 ml hCMEC/D3-Standardmedium aufgefüllt. Durch Schwenken wurden die Zellen in der Gewebekulturflasche gleichmäßig verteilt.

2.4.4 Kultivierung von HT29B/6-Zellen

HT29B/6-Zellen wurden in 75 cm²-Gewebekulturflaschen (Greiner) in HT29/B6-Standardmedium (Tabelle 17) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden konfluente Zellen einmal mit PBS-Puffer gespült und durch fünf- bis zehnminütige Inkubation mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Tabelle 17) bei 37°C auf einer Wärmeplatte von der Gewebekulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 8,5 ml HT29/B6-Standardmedium aufgenommen und mit einer Pasteurpipette vorsichtig resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 3,3 ml in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit 10 ml HT29B/6-Standardmedium aufgefüllt. Durch Schwenken wurden die Zellen in der Gewebekulturflasche gleichmäßig verteilt.

Tabelle 17: Kulturbestandteile für HT29/B6-Zellen.

Medium/Lösung	Zusammensetzung
HT29B/6-Standardmedium	RPMI Medium 1640 5% (v/v) FCS 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% (v/v)/0,02% (w/v) in PBS

2.4.5 Isotopische Markierung für SILAC-Experimente

Für das SILAC-Experiment wurden zwei Populationen von Zellen parallel entweder in Anwesenheit von unmarkierten [¹²C]-Aminosäuren und den entsprechenden isotoopenmarkierten [¹³C]-Aminosäuren kultiviert. Um einen hohen Grad an markierten Proteinen zu gewährleisten, wurde sowohl isotoopenmarkiertes L-Lysin als auch L-Arginin eingesetzt. Speziellen L-arginin- und L-lysinfreien Kulturmedien (2.1.4) wurden dazu normales oder isotoopenmarkiertes L-Arginin und L-Lysin zugegeben.

2.4.6 Zellzahlbestimmung

Zellzahlbestimmungen wurden mit dem CASY[®]-1-Zellzähler (2.1.1) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einer 75 cm²-Gewebekulturflasche mit 2 ml Trypsin abgelöst und mit 4 ml Standardmedium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 25 µl in 10 ml Casyton[®]-

Lösung gegeben und mit dem Zellzähler vermessen. Pro Probe wurden drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert der Messungen als Zellzahl/ml ermittelt.

2.4.7 Kryokonservierung von Zellen

Die langfristige Lagerung der eukaryotischen Zellen erfolgte in einem Kryocontainer (2.1.1) in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben durch Inkubation mit Trypsin bei 37°C auf einer Wärmeplatte von der Gewebekulturflasche abgelöst. Durch Resuspendieren der Zellen in 5 ml Standardmedium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (1600 x g, 3 Minuten, RT) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 1,8 ml eiskaltem Einfriermedium (90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen gegeben und in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter (2.1.1) zunächst langsam auf -80°C gekühlt bevor die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff vorgenommen wurde.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Die Zellen wurden sofort in Standardmedium aufgenommen, in eine Gewebekulturflasche überführt und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Nachdem ca. 50% der Zellen angewachsen waren, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.4.8 Herstellung von eukaryotischen Zelllysaten

Konfluente Zellen wurden zweimal mit PBS-CM-Puffer gewaschen und anschließend zweimal mit 1,7 ml PBS geschabt. Durch Zentrifugation (300 x g, 10 Minuten, 4°C) wurden die Zellen sedimentiert, und die Zellpellets entweder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80° C gelagert oder sofort verwendet.

Für die Zellyse wurden die Pellets in eukaryotischem Lysepuffer (Tabelle 18) aufgenommen (250 µl/75 cm²-Zellkulturflasche) und resuspendiert. Zum Aufschließen der Zellen wurde die Zellsuspension fünfmal durch eine Kanüle (24-G) gepresst. Die Suspension wurde für 30 Minuten auf Eis gestellt und zentrifugiert (10000 x g, 10 Minuten, 4°C). Das Lysat wurde direkt eingesetzt.

Tabelle 18: Lysepuffer für eukaryotische Zellen.

Eukaryotischer Lysepuffer	Zusammensetzung
1% Triton X-100 (TX-100)	1% (v/v) Triton X-100 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl eukaryotischer Proteaseinhibitormix in dest. Wasser
1% CHAPS	1% (w/v) CHAPS 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl eukaryotischer Proteaseinhibitormix in dest. Wasser
Ripa	1% (v/v) NP-40 0,5% (w/v) DOC 0,1% (w/v) SDS 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl eukaryotischer Proteaseinhibitormix in dest. Wasser

2.4.9 Immunfluoreszenzfärbungen

NRC-Zellen wurden in einer Zellkulturtestplatte auf Deckgläschen (\varnothing 12 mm) ausgesät, die vorher mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden. Für die Beschichtung wurden die Deckgläschen eine Stunde bei 37°C mit Poly-L-Lysin-Lösung (Tabelle 19) inkubiert. Konfluente NRC-Zellen einer 75 cm²-Gewebekulturflasche wurden wie in 2.4.2 beschrieben trypsinisiert. Auf jedes Deckgläschen wurden NRC-Zellen mit einer Dichte von 600 Zellen/cm² sowie 425 µl NRC-Standardmedium gegeben. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und die Deckgläschen dann auf eine Haltevorrichtung gestellt. Zur Permeabilisierung und Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen wurden diese zunächst für 5 Minuten in Aceton und danach jeweils 1 Minute in 70%igen Ethanol und in PBS-Puffer gestellt. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach oben auf Parafilm®M in eine feuchte Kammer gelegt. Auf die Deckgläschen wurde für mindestens 10 Minuten 60 µl Blockierungspuffer-IF (Tabelle 19) gegeben. Danach wurden die Zellen in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert, der nach Herstellerangaben (2.1.6) mit 60 µl Blockierungspuffer-IF verdünnt wurde. Für Ko-Lokalisationsstudien wurden Doppelfärbungen durchgeführt und an dieser Stelle ein Gemisch zweier primärer Antikörper eingesetzt. Nachdem die Zellen fünfmal 2 Minuten mit 60 µl Blockierungspuffer-IF gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der nach Angaben des Herstellers (2.1.6) mit Blockierungspuffer-IF verdünnt wurde. Bei Doppelfärbungen wurde ein Gemisch zweier sekundärer Antikörper eingesetzt. Für die Anfärbung von Zellkernen enthielt die zweite Antikörper-Lösung außerdem

4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI), das nach den Angaben des Herstellers (2.1.3) eingesetzt wurde. Von der Antikörper-Lösung wurden 60 µl für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen nochmals fünfmal 2 Minuten mit Blockierungspuffer-IF gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen Einbettungsmedium gelegt und zum Trocknen bei 4°C über Nacht gelagert.

Tabelle 19: Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbungen.

Lösung	Zusammensetzung
Poly-L-Lysin-Lösung	25 µg/ml in dest. Wasser
Blockierungspuffer-IF	1% (w/v) BSA 0,05% (v/v) Tween-20 0,02% (w/v) Na-Azid in PBS

Die gefärbten Zellen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510 META-NLO, Carl Zeiss Jena) analysiert, wobei ein PlanNeofluar 63x/1.4 Öl-Objektiv (Carl Zeiss Jena) benutzt wurde. Die AlexaFluor488-Farbstoffe wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm (Argon-Laser) angeregt und die Emission zwischen 500 und 530 nm detektiert. Die Anregung der Cy3-Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte bei einer Wellenlänge von 543 nm (HeNe-Laser), und die Emission wurde bei einer Wellenlänge >560 nm detektiert. Der Cy5-Fluoreszenzfarbstoff wurde bei einer Wellenlänge von 633 nm (HeNe-Laser) angeregt, und die Emission bei einer Wellenlänge von >650 nm detektiert. Die Anregung des DAPI-Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte bei einer Wellenlänge von 364 nm (Enterprise-Laser) und die Detektion bei einer Wellenlänge zwischen 385-470 nm.

2.5 Proteinanalytische Methoden

2.5.1 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Die mittels Affinitätsreinigung (2.3.9.2, 2.3.10) angereicherten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt (2.3.5) und mit Coomassie-Färbelösung 2 (Tabelle 9) angefärbt (2.3.6). Für die massenspektrometrische Analyse dieser Proteine wurde die komplette Spur des Gels mit dem Skalpell zerschnitten. Je nach Proteinmenge hatten die Gelstücke eine Breite von 1 bis 5 mm bei einer Höhe von 1 mm. Die Gelstücke wurden dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur in 500 µl deionisiertem Wasser (Milli-Q) im Schüttler (2.1.1) gewaschen. Nach dem Entfernen des Wassers wurden je 100 µl Acetonitril-

Ammoniumbicarbonat-Lösung (Tabelle 20) zu den Gelstücken gegeben, und diese dann bei Raumtemperatur 5 Minuten im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke durch Inkubation in 50 µl Acetonitril für zweimal 2 Minuten bei Raumtemperatur geschrumpft und innerhalb von 20 Minuten in einer SpeedVac-Zentrifuge (medium, Raumtemperatur) (2.1.1) getrocknet. Danach wurde zu den Gelstücken Trypsin-Lösung (Tabelle 20) gegeben, so dass die Gelstücke komplett von der Trypsin-Lösung bedeckt waren. Nach der Inkubation (über Nacht, 37°C) wurde die Trypsin-Lösung in einer PicoFuge™ (2.1.1) zentrifugiert, und das Trypsin durch Zugabe der gleichen Menge an Trifluoressigsäure-Lösung (Tabelle 20) inaktiviert. Nachdem die Gelstücke für 2 Minuten in ein Ultraschallbad (2.1.1) gestellt wurden, wurden die Lösungen wieder zentrifugiert. Die Überstände wurden komplett in ein Q-TOF-Probengefäß (2.1.2) überführt. Zu den verbleibenden Gelstücken wurden für zweimal 2 Minuten 20 µl Acetonitril gegeben und die Überstände auch jeweils in die entsprechenden Q-TOF-Probengefäße überführt. Die Probengefäße wurden ohne Plättchen ca. 20 Minuten in die SpeedVac-Zentrifuge gestellt, um das Acetonitril aus der Probe zu entfernen. Durch Zugabe von 6 µl Acetonitril-Trifluoressigsäure-Lösung (Tabelle 20) wurde die Probe wieder resuspendiert. Das Q-TOF-Probengefäß wurde mit Teflon-Septen und Deckel verschlossen und gegebenenfalls bei -20°C gelagert.

Tabelle 20: Lösungen für die massenspektrometrischen Analysen.

Lösung	Zusammensetzung
Acetonitril-Ammoniumbicarbonat-Lösung	50% (v/v) Acetonitril in 50 mM Ammoniumbicarbonat
Trypsin-Lösung	1,25 µg Trypsin in 199 µl 5 mM Ammoniumbicarbonat
Trifluoressigsäure-Lösung	0,5% (v/v) Trifluoressigsäure in Acetonitril
Acetonitril-Trifluoressigsäure-Lösung	0,1% (v/v) Trifluoressigsäure 5% (v/v) Acetonitril in Milli-Q

2.5.2 Massenspektrometrische Analyse LC-ESI-MS/MS

Die Messung der Proben wurde von Dr. Michael Schümann (Abteilung Massenspektrometrie, FMP) durchgeführt. Bei dem Massenspektrometer handelte es sich um ein *Q-TOF Ultima quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer* (2.1.1), das mit einer *Z-spray nanoelectrospray* Quelle ausgestattet ist. Vor das Massenspektrometer ist ein *CapLC*-Flüssigreinigungssystem (2.1.1) geschaltet. In Abhängigkeit von der Konzentration der Proteine wurden zwischen 3 µl und 6 µl Probe eingesetzt. Die LC-Auftrennung erfolgte über die Kapillarsäule bei einer Flussrate von 200 nl/min und einem Acetonitrilgradienten in 0,1% (v/v) Ameisensäure. Die Analyse mit dem Tandemmassenspektrometer wurde im positiv-Ionen-Modus durchgeführt. Die Scandauer

lag bei einer Sekunde, wobei m/z -Verhältnisse in einem Bereich zwischen 300 und 1900 erfasst wurden. Das Gerät schaltete automatisch in den MS/MS-Modus um, wenn ein *peak* eine Intensität von 120 counts oder größer hatte und die Ionen mindestens zweifach geladen waren. Das m/z -Verhältnis der MS/MS-Spektren lag in einem Bereich zwischen 50 und 1990. Mit dem Programm MassLynx 4.0 (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) wurden die LC-MS/MS-Rohdaten in *peaklist*-Dateien überführt, um eine Datenbanksuche zur Identifizierung der Proteine durchführen zu können. Mit Hilfe des MASCOT-Servers (Matrix Science Ltd, London, UK) wurde mit den *peaklist*-Dateien eine Suche in der Datenbank SwissProt durchgeführt, wobei die in Tabelle 21 aufgeführten Parameter benutzt wurden.

Tabelle 21: MASCOT-Parameter für die Datenbanksuche in SwissProt.

Parameter	Einstellung (normal)	Einstellung (SILAC-Quantifizierung)
Database	SwissProt	SwissProt
Taxonomy	All species	All species
Enzyme	Trypsin	Trypsin
Max missed cleavages	2	2
Mass tolerance precursor ions	150 ppm	150 ppm
Mass tolerance sequence ions	0,1 Da	0,1 Da
Possible modifications	Acrylamide modification of cysteine Methionine oxidation	Acrylamide modification of cysteine Methionine oxidation $^{13}\text{C}_6$ -arginine and $^{13}\text{C}_6$ -lysine
Data format	Micromass (.pkl)	Mascot generic

2.5.3 SILAC-Quantifizierung von Proteinen

Für die Quantifizierung musste ein Protein mindestens ein isotoopenmarkiertes Arginin oder Lysin enthalten. Die Quantifizierung der Peptide erfolgte mit der *MSQuant-Software* (<http://msquant.sourceforge.net>). Dafür benötigte das Programm für jede Fraktion das MASCOT-Suchergebnis im HTML-Format und den Rohdaten-Satz. Durch MS-Quant wurde die Signalintensität der Peptide gegen die Zeit aufgetragen, zu der die Peptide von der Reinigung-Säule eluiert sind. Durch die Erfassung der Intensität zu mehreren Zeitpunkten ergab sich für jedes Peptid ein Elutionsprofil, das als extrahiertes Ionen-Chromatogramm (XIC) bezeichnet wird (Abbildung 6). Die XIC-Fläche verhält sich proportional zu der Abundanz des Peptids. Die Fläche des Elutionsprofils des isotoopenmarkierten [^{13}C]- und des entsprechenden unmarkierten [^{12}C]-Peptids werden von *MSQuant* zueinander ins Verhältnis gesetzt.

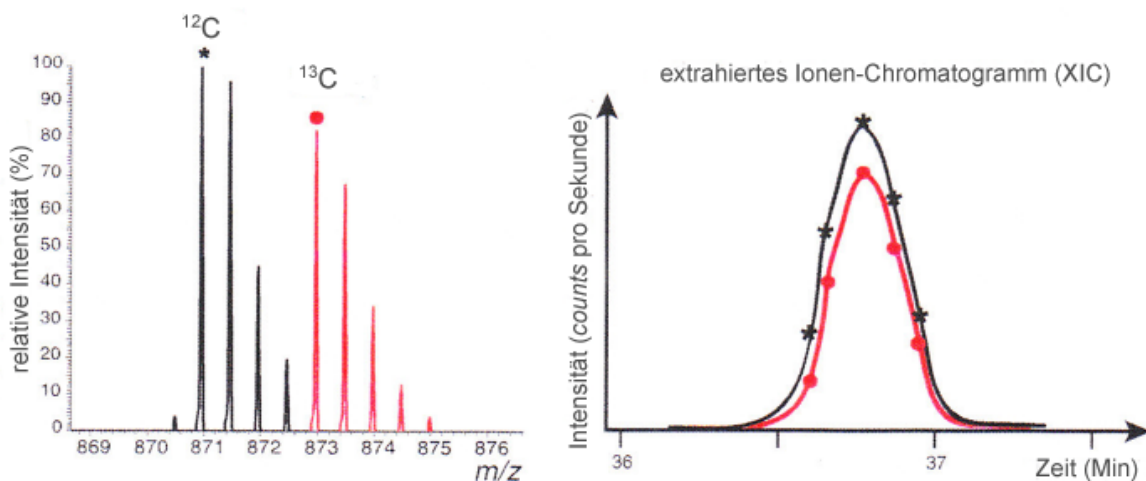


Abbildung 6: Extrahierte Ionen-Chromatogramme (XIC) eines isotopenmarkierten [^{13}C]- und des entsprechenden unmarkierten [^{12}C]-Peptides.

a) Im MS-Spektrum wird das Masse/Ladung-Verhältnis (m/z) gegen die relative Intensität (%) aufgetragen. Bei einem zweifach geladenen Peptid, das nur eine markierte Aminosäure besitzt, ist das Isotopenmuster des markierten Peptids um 3 m/z -Einheiten nach rechts verschoben. b) Für die Quantifizierung durch *MS-Quant* werden die Signalintensitäten der Peptide gegen die einzelnen Zeitpunkte aufgetragen, zu der die Peptide von der Reinigung-Säule eluiert sind. Dadurch ergibt sich für jedes Peptid ein Elutionsprofil, das als extrahiertes Ionen-Chromatogramm (XIC) bezeichnet wird. Bei der Quantifizierung werden das Elutionsprofil des isotopenmarkierten [^{13}C]- und des entsprechenden unmarkierten [^{12}C]-Peptids zueinander ins Verhältnis gesetzt.

2.5.4 Bestimmung der Markierungseffizienz

Voraussetzung für eine möglichst genaue Quantifizierung war ein hoher Anteil an isotopenmarkierten Peptiden (>90%). Aus diesem Grund wurde im Vorfeld der Affinitätsreinigung die Markierungseffizienz bestimmt. Nur das isotopenmarkierte Zelllysate wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt, einige Banden ausgeschnitten, die Proteine tryptisch verdaut und mit ESI-MS/MS analysiert. Die Bestimmung des prozentualen Anteils der isotopenmarkierten Peptide wurde mit der MSQuant-Software durchgeführt (2.5.3).

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Analyse des *tight junction*-Proteoms leisten. Zunächst erfolgte die methodische Entwicklung einer Affinitätsreinigung, bei der ein GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsprotein eingesetzt wurde, um Claudine und Claudin-assoziierte Proteine anzureichern. Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Durchführung einer Proteomanalyse, die auf der etablierten Affinitätsreinigung basierte, sowie die weiterführende Analyse der im Rahmen dieser Proteomanalyse identifizierten Proteine. Schließlich wurde eine weitere Proteomanalyse auf der Basis einer Affinitätsreinigung mit einem GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Fusionsprotein durchgeführt, um potentielle Wechselwirkungspartner des Tricellulins anzureichern.

3.1 Optimierung der Parameter der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung

Im Rahmen der methodischen Entwicklung der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurden unterschiedliche Parameter getestet. Durch die Charakterisierung verschiedener Zellkultursysteme und Lysepuffer wurde zunächst die Verfügbarkeit verschiedener Claudine bzw. eine hohe Solubilisierungsrate an Claudinen sichergestellt. Einen weiteren Schwerpunkt der Optimierungen stellte die Reduzierung von unspezifischen Bindungen bei der Durchführung der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung dar.

3.1.1 *Normal rat cholangiocyte*-Zellen als Modellsystem für die Untersuchung von *tight junctions*

Für die Entwicklung einer Methode zur Anreicherung von Claudinen und Claudin-assoziiierter Proteine musste zunächst eine geeignete Zelllinie gefunden werden, durch die eine gute Expression der Claudine sicher gestellt werden konnte. Bereits sehr gut etablierte Modelle für die Untersuchung von *tight junctions* stellen *human carcinoma colon cells* (Caco-2) und *Madine Darby canine kidney cells* (MDCK) dar. MDCK-Zellen sind für Proteomanalysen ungeeignet, da z. B. im Vergleich zur Ratte oder des Menschen in den Datenbanken in der Regel deutlich weniger Sequenzen des Hundes geführt werden. Eine hohe Sequenzabdeckung ist aber notwendig, da für die Identifizierung von Proteinen die in der Massenspektrometrie erzeugten Daten mit den theoretischen Werten der Datenbank abgeglichen werden. Hinsichtlich einer hohen Sequenzabdeckung in der SwissProt-Datenbank stellten *normal rat cholangiocyte cells* (NRC) eine mögliche Alternative zu

Caco-2-Zellen dar, die im Hinblick auf die Expression von *tight junction*-Proteinen noch nicht ausführlich charakterisiert waren. Die beiden Zelllinien wurden daher hinsichtlich der Expression von Claudinen miteinander verglichen. Konfluente Zellen beider Zelllinien wurden mit Triton X-100 (1%) lysiert, und die Lysate anhand von Western Blots bezüglich der Expression von verschiedenen Claudinen analysiert. Dafür standen Antikörper gegen Claudin-1, -3, -4, -5 und -7 zur Verfügung. Von den Lysaten wurden jeweils 20 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Als Ladekontrolle diente eine Ponceau-S-Färbung (Abbildung 7a).

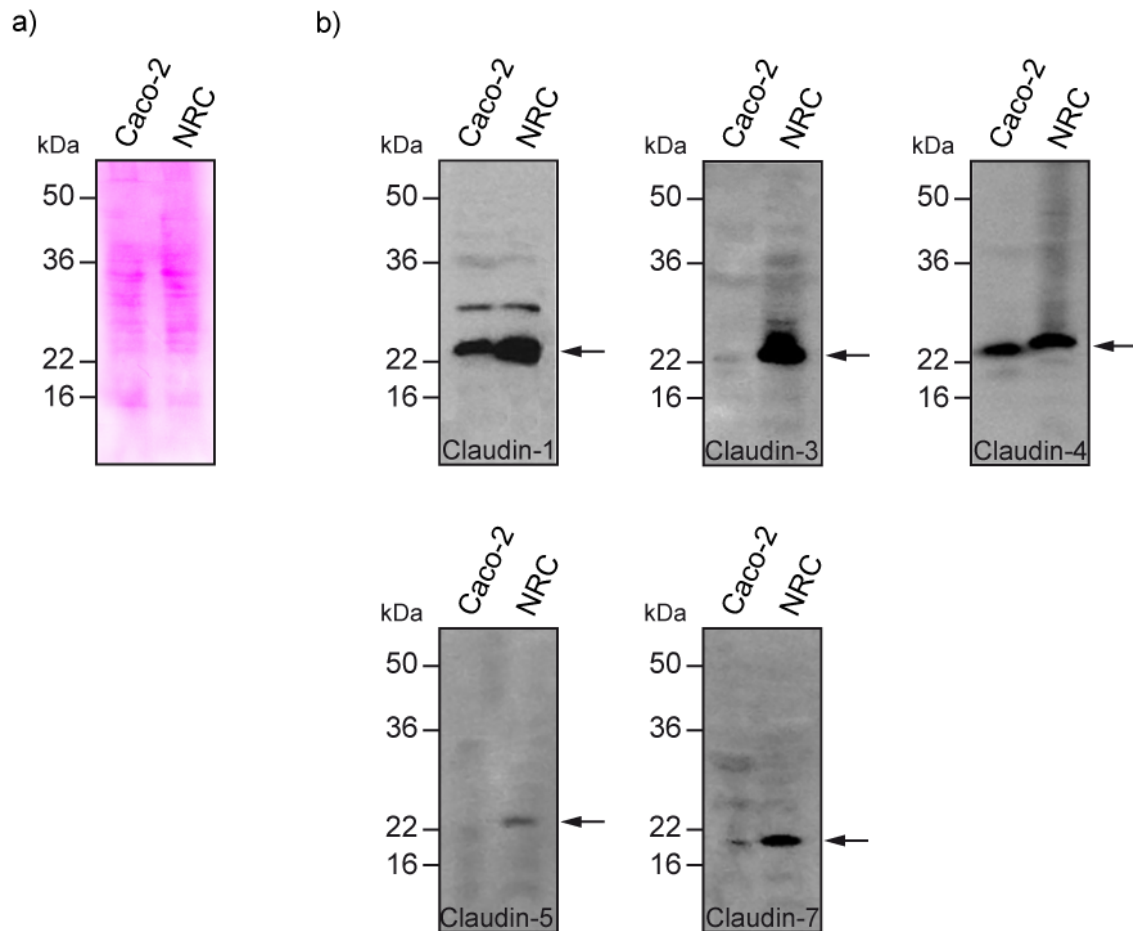


Abbildung 7: Charakterisierung von Caco-2- und NRC-Zellen hinsichtlich der Expression von Claudinen.

Zelllysate (1% Triton X-100) von Caco-2- und NRC-Zellen wurden durch Western Blots bezüglich der Expression von Claudinen analysiert. a) Als Ladekontrolle diente eine Ponceau-S-Färbung. b) Bei der Western Blot-Analyse wurden Antikörper gegen Claudin-1, -3, -4, -5 und -7 eingesetzt.

Claudine haben eine molekulare Masse von 20-27 kDa. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass Claudin-1, -3, -4, und -7 sowohl in NRC-Zellen als auch in Caco-2-Zellen exprimiert wurden (Abbildung 7b). Claudin-5 wurde nur in NRC-Zellen exprimiert. Eine densitometrische Quantifizierung der detektierten Banden ergab, dass Claudin-1 um den Faktor 3,5 und Claudin-3 um den Faktor 50 stärker in NRC-Zellen als in Caco-2-Zellen exprimiert wurde. Des Weiteren wurde in NRC-Zellen doppelt so viel Claudin-4 und fünfmal so viel Claudin-7 gefunden wie in Caco-2-Zellen. Aus diesem Grund wurden für die

nachfolgenden Experimente NRC-Zellen als Modellsystem für die Proteomanalyse von *tight junctions* herangezogen.

3.1.2 Solubilisierung von Claudinen durch Triton X-100

Konfluente NRC-Zellen wurden mit Lysepuffern, die 1% Triton X-100 oder 1% CHAPS enthielten, sowie mit Ripa-Puffer (1% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS) lysiert. Anschließend wurde durch Western Blots überprüft, inwieweit Claudine gelöst wurden, um zu bestimmen, durch welches Detergenz Claudine am besten solubilisiert werden. Es wurden Antikörper gegen Claudin-1, -3 und -4 eingesetzt (Abbildung 8a).

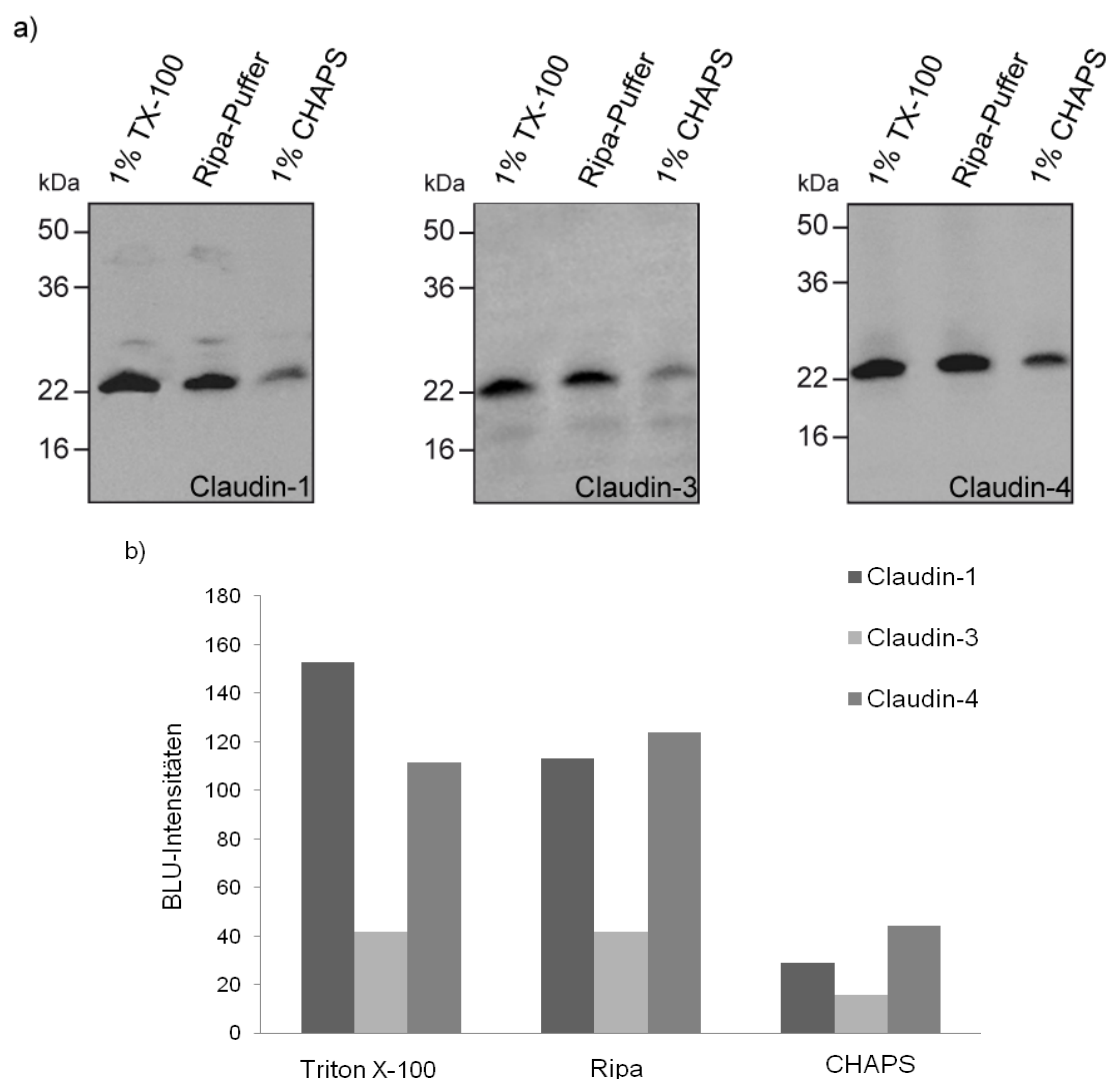


Abbildung 8: Vergleich verschiedener Lysepuffer hinsichtlich der Solubilisierung von Claudinen.

Für die Bestimmung des für die Solubilisierung von Claudinen am besten geeigneten Detergenz, wurden NRC-Zellen mit Ripa-Puffer und Lysepuffern, die 1% CHAPS oder 1% Triton X-100 enthielten lysiert. a) Anhand von Western Blots wurde analysiert, inwieweit Claudin-1, -3 und -4 in Lösung vorlagen. b) Zusammenfassung der BLU-Intensitäten der Claudin-Signale der Western Blots.

Durch 1% Triton X-100 wurde um den Faktor 1,5 mehr Claudin-1 gelöst als durch den Ripa-Puffer und fünfmal mehr als durch 1% CHAPS (Abbildung 8a, b). Durch den Ripa-Puffer wurde viermal mehr Claudin-1 solubilisiert als durch 1% CHAPS. Durch den Lysepuffer mit 1% Triton X-100 und den Ripa-Puffer wurden gleiche Mengen und durch 1% CHAPS dreimal weniger Claudin-3 solubilisiert. Claudin-4 wurde durch 1% TX-100 und den Ripa-Puffer im gleichen Maß solubilisiert, wohingegen durch 1% CHAPS dreimal weniger Claudin-4 gelöst wurde.

Der Vergleich der Lysepuffer zeigte, dass mit 1% CHAPS weniger Claudine als mit 1% Triton X-100 oder Ripa-Puffer solubilisiert wurden. Es konnte kein wesentlicher Unterschied im Anteil an Claudinen im Zelllysatsatz zwischen dem Ripa-Puffer und dem Lysepuffer mit 1% Triton X-100 festgestellt werden. Im Hinblick auf gering affine Protein-Wechselwirkungen wurde die Zelllyse während der nachfolgenden Experimente jedoch immer mit 1% Triton X-100 durchgeführt, da in Gegenwart von Triton X-100 mildere Solubilisierungsbedingungen herrschen als in Gegenwart des Ripa-Puffers (Seddon et al., 04).

3.1.3 Durchführung der Affinitätsreinigung mit dem gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsprotein zur Anreicherung von Claudinen aus einem eukaryotischen Zelllysatsatz

Im Zuge der Entwicklung der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurden drei verschiedene Varianten durchgeführt und diese in Bezug auf die Anreicherung von Claudinen miteinander verglichen. Zunächst wurde der durch Zentrifugation geklärte Rohextrakt der Expression von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ in *E.coli* auf die Sepharose gegeben, um das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial zu binden. Bei der zweiten Variante wurde nicht der *E. coli*-Rohextrakt verwendet, sondern das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ durch einen zusätzlichen Schritt gereinigt, bevor es an das Säulenmaterial gebunden wurde. Bei diesen beiden Varianten wurde das NRC-Zelllysatsatz zum GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ gegeben, um Claudine anzureichern. Im Rahmen der dritten Variante der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurden die NRC-Zellen vor der Zelllyse mit dem gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert, d. h. die Bindung des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an die Claudine erfolgte vor der Zelllyse. Bei jeder Affinitätsreinigung wurde als Kontrolle parallel immer derselbe Ansatz mit dem bloßen GST-Affinitätspepitop durchgeführt. Da Claudin-3 einer der beschriebenen Rezeptoren für CPE ist, wurden die drei Affinitätsreinigungen zunächst durch Western Blots hinsichtlich der Claudin-3-Anreicherung analysiert. Darüber hinaus wurde überprüft, ob auch Claudin-1 angereichert werden konnte. Da in der Literatur gezeigt wurde, dass CPE nicht an Claudin-1, -2, -5 und -10 bindet (Fujita et al., 00), diente die Anreicherung von Claudin-1 als Maß für eine Mitanreicherung von Claudinen, die nicht

direkt an CPE binden und als Kontrolle, dass unter den gewählten Bedingungen Ko-Reinigungen von Proteinen möglich waren.

Durch die Affinitätsreinigung, bei der der *E. coli*-Rohextrakt zum Binden des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial eingesetzt wurde, wurde Claudin-3 spezifisch angereichert (Abbildung 9a). Das Zelllysate diente als Positivkontrolle. Eine densitometrische Quantifizierung der Signalintensitäten zeigte, dass die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Durchflussfraktion, bezogen auf die detektierte Menge im Zelllysate, nur noch 6% an Claudin-3 enthielt, während in der GST-Durchflussfraktion noch 78% an Claudin-3 detektiert wurde. Durch das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ wurde Claudin-3 um den Faktor 45 stärker angereichert als durch das GST-Affinitätspeptid der Kontrolle.

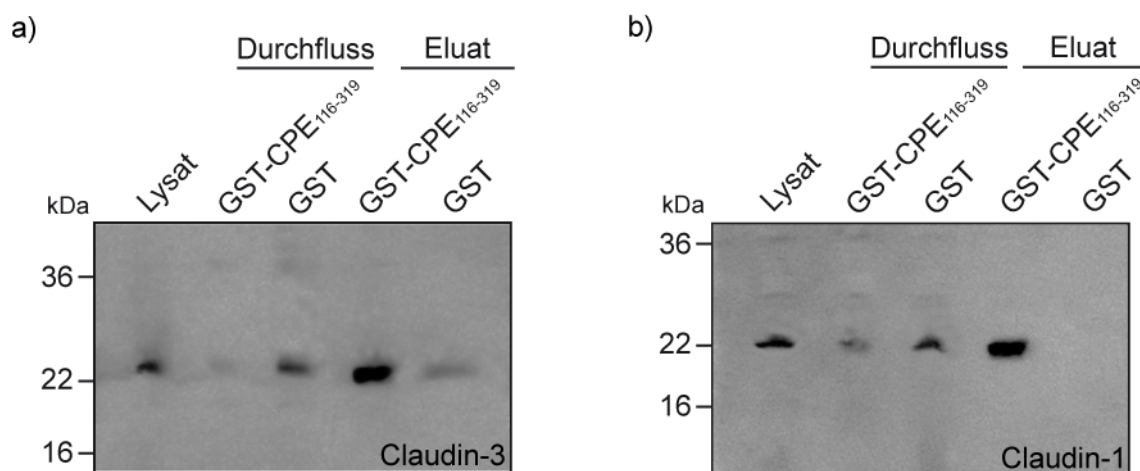


Abbildung 9: Anreicherung von Claudin-3 und Mitanreicherung von Claudin-1 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung mit dem *E. coli*-Rohextrakt.

Bei dieser Variante der Affinitätsreinigung wurde der *E. coli*-Rohextrakt zum Binden des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial eingesetzt. Anhand von Western Blots wurde analysiert, ob (a) Claudin-3 spezifisch angereichert wurde und (b) eine Mitanreicherung von Claudin-1 möglich war.

Zudem wurde eine Mitanreicherung von Claudin-1 gezeigt, da Claudin-1 ausschließlich im GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Eluat und nicht im Eluat der GST-Kontrolle gefunden wurde (Abbildung 9b). Verglichen mit dem Zelllysate enthielten die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Durchflussfraktionen noch 9% und die Durchflussfraktion der GST-Kontrolle 36% Claudin-1.

Eine erste massenspektrometrische Analyse der durch diese Form der Affinitätsreinigung gebundenen Proteine zeigte, dass 45% der identifizierten Proteine prokaryotischen Spezies zugeordnet wurden und somit aus der Expression des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ in *E. coli* stammten. Um den Anteil der bakteriellen Proteine zu reduzieren, wurde nicht der *E. coli*-Rohextrakt zum Binden des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial benutzt, sondern dieses durch einen zusätzlichen Schritt gereinigt. Durch beide Varianten der Affinitätsreinigung wurden nach Bindung gleicher Mengen des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial gleiche Mengen an Claudin-3 angereichert werden (Abbildung 10a, b). Der zusätzliche Reinigungsschritt hat das Bindungsverhalten des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ von Claudin-3 folglich nicht beeinträchtigt.

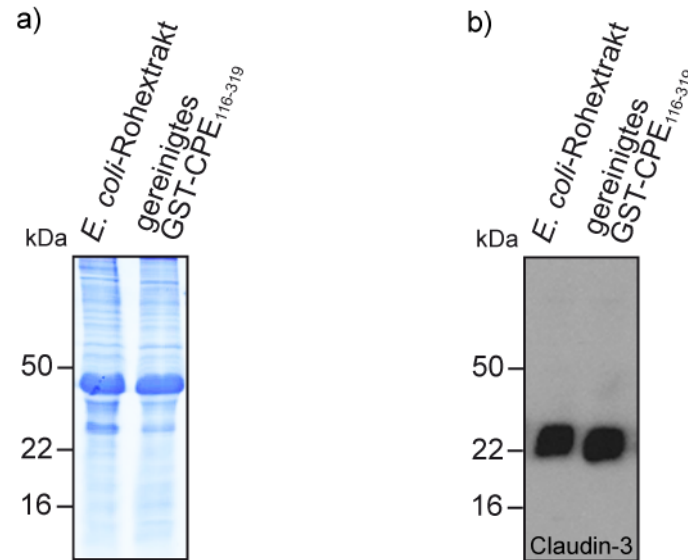


Abbildung 10: Vergleich des Bindungsvermögens des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ im *E. coli*-Rohextrakt und des gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Claudin-3.

Es wurde verglichen, ob durch die Affinitätsreinigung mit dem gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ im gleichen Maße Claudin-3 angereichert wurde wie durch die Affinitätsreinigung, bei der der *E. coli*-Rohextrakt eingesetzt wurde (b), nachdem gleiche Mengen des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial gebunden wurden (a).

Eine Western Blot-Analyse der Variante der Affinitätsreinigung, bei der gereinigtes GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ eingesetzt wurde, zeigte, dass Claudin-3 spezifisch angereichert wurde (Abbildung 11a).

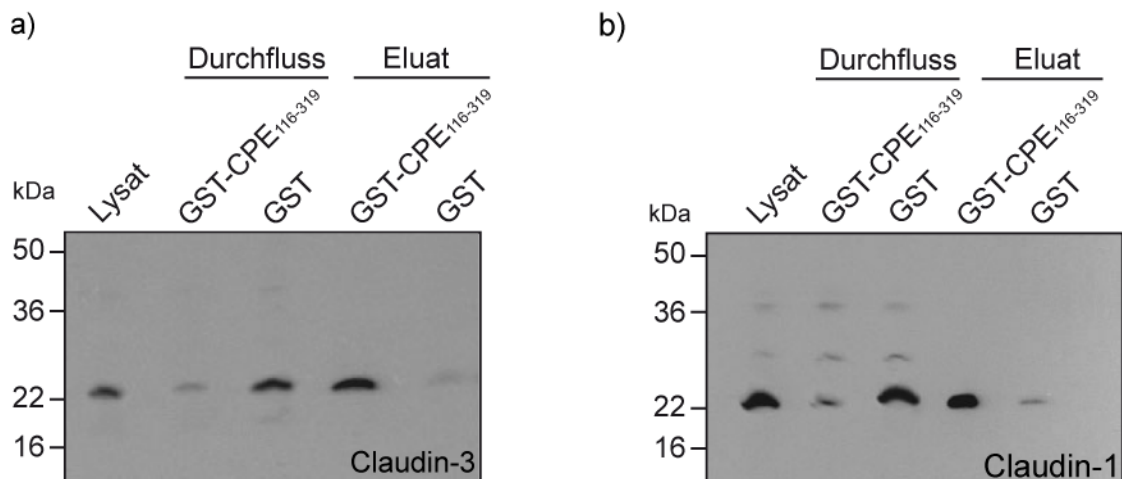


Abbildung 11: Anreicherung von Claudin-3 und Mitanreicherung von Claudin-1 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung mit dem gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉.

Bei dieser Variante der Affinitätsreinigung wurde gereinigtes GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial gebunden. Durch Western Blot-Analyse wurde untersucht, ob Claudin-3 (a) spezifisch angereichert und Claudin-1 (b) spezifisch mitangereichert wurde.

Die Quantifizierung der Bandenintensitäten ergab, dass im GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Eluat um den Faktor 40 mehr Claudin-3 als im Eluat der GST-Kontrolle vorlag. Während die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Durchflussfraktion verglichen mit dem Zelllysat 10% an Claudin-3 enthielt,

wurden in der Durchflussfraktion der GST-Kontrolle 80% an Claudin-3 detektiert. Des Weiteren wurde Claudin-1 durch diese Form der Affinitätsreinigung mitangereichert, da Claudin-1 durch das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ um den Faktor 50 stärker angereichert wurde als durch das GST-Affinitätsepitop der Kontrolle (Abbildung 11b). Die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Durchflussfraktion enthielt verglichen mit dem Zelllysat nur noch 10% an Claudin-1, während der Anteil an Claudin-1 in der GST-Durchflussfraktion nicht reduziert wurde.

Im Rahmen der dritten Variante der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurden die NRC-Zellen vor der Zelllyse mit dem gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert. Die Inkubation der Zellen mit dem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ erfolgte bei 4°C bzw. 37°C. Als Kontrolle wurden NRC-Zellen bei 4°C mit dem GST-Affinitätsepitop inkubiert. Unabhängig davon, ob die Zellen mit dem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ oder dem GST-Affinitätsepitop inkubiert wurden, wurde durch die Lyse der Zellen, die bei einer Temperatur von 4°C behandelt wurden, um den Faktor 1,5 weniger Claudin-3 solubilisiert als bei denen, die bei einer Temperatur von 37°C behandelt wurden (Abbildung 12a). Durch die Inkubation der Zellen mit dem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bei 4°C wurde um den Faktor 1,3 mehr Claudin-3 angereichert als durch die Inkubation bei 37°C (Abbildung 12b).

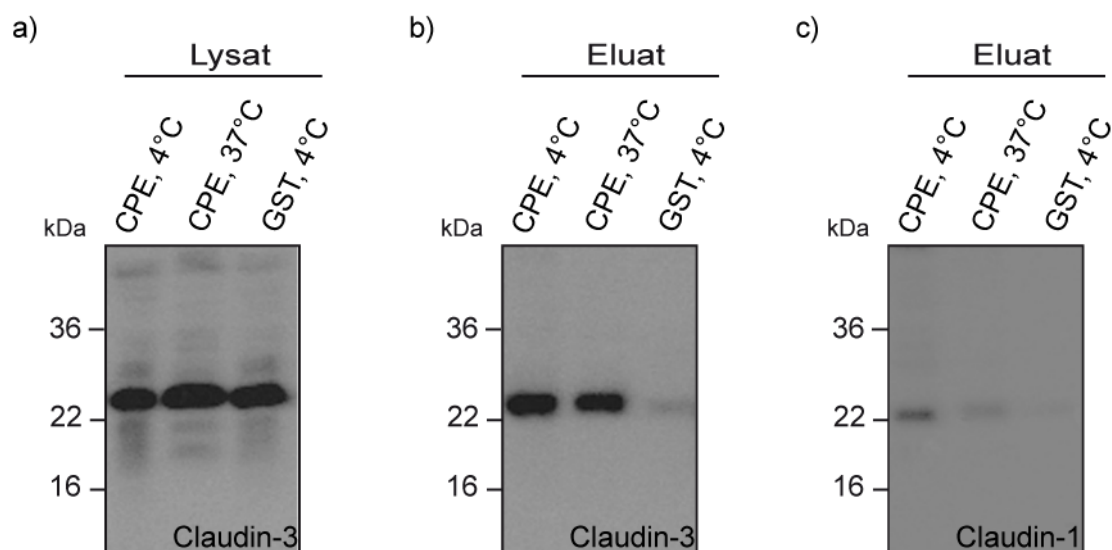


Abbildung 12: Anreicherung von Claudin-3 und Mitanreicherung von Claudin-1 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung nach Inkubation der Zellen mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ vor der Zelllyse.

Bei dieser Variante der Affinitätsreinigung wurden NRC-Zellen vor der Zelllyse mit dem gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit dem bloßen GST-Affinitätsepitop. Nachdem die Solubilisierung von Claudin-3 überprüft wurde (a), wurde anhand von Western Blots analysiert, inwieweit Claudin-3 angereichert (b) und Claudin-1 (c) mitangereichert wurde.

Die Anreicherung war in beiden Fällen spezifisch, da um den Faktor 4,5 bzw. 3,5 mehr Claudin-3 als durch das GST-Affinitätsepitop der Kontrolle angereichert wurde. Dagegen wurde nur um den Faktor 1,5 bzw. 0,5 mehr Claudin-1 durch die Inkubation der Zellen mit

GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bei 4°C bzw. 37°C mitangereichert als durch die Inkubation der Zellen mit dem GST-Affinitäsepitop.

Hinsichtlich der Tatsache, dass die durch die Affinitätsreinigung angereicherten Proteine durch Massenspektrometrie analysiert werden sollten, wurde für die anschließenden Experimente nur noch die Variante der Affinitätsreinigung durchgeführt, bei der gereinigtes GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial gebunden wurde. Außerdem wurden die NRC-Zellen zuerst lysiert und dann mit dem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert, da sich diese Variante der Affinitätsreinigung bezüglich der Mitanreicherung von Claudin-1 als die effizientere herausstellte.

3.1.4 Verbesserung des Reinheitsgrades des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsproteins durch erhöhte DTT- und Salzkonzentrationen

Wenn GST-Affinitätsreinigungen zur Anreicherung von Proteinen genutzt werden, die anschließend durch massenspektrometrische Methoden analysiert werden, ist ein hoher Reinheitsgrad des Köderproteins wichtig. Deshalb wurden bei der Reinigung des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsproteins Parameter variiert, um unspezifische Bindungen von Proteinen aus dem *E. coli*-Rohextrakt an das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ zu reduzieren. Die Reinigung des rekombinanten Proteins wurde in Gegenwart von 5 mM DTT durchgeführt und die Salzkonzentration im *E. coli*-Rohextrakt und im Agarose-Waschpuffer auf 1 M NaCl erhöht. Des Weiteren wurde nach der Reinigung des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ ein zusätzlicher säulenchromatographischer Reinigungsschritt durchgeführt. Der Reinheitsgrad des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ nach Anwendung der verschiedenen Maßnahmen wurde durch SDS-Gelelektrophorese der erhaltenen Proteinfractionen mit anschließender Silberfärbung überprüft.

Durch Zugabe von 5 mM DTT zu allen Puffern sowie durch Zugabe von 1 M NaCl zum *E. coli*-Rohextrakt bzw. Agarose-Waschpuffer wurde im Vergleich zu der konventionellen Reinigung des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ eine Reduzierung an unspezifisch bindenden Proteinen erreicht (Abbildung 13). Durch den zusätzlichen Reinigungsschritt mit der Größenausschluss-Chromatographie (HPLC) wurde dagegen nur eine leichte Erhöhung des Reinheitsgrades des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ erwirkt.

Die Silberfärbung der Proteine zeigte, dass bis auf den zusätzlichen Reinigungsschritt mit der Größenausschluss-Chromatographie alle Maßnahmen im Vergleich zur ursprünglichen Vorgehensweise eine Reduzierung unspezifisch bindender Proteine bewirkten. Sie wurden deshalb bei den nachfolgenden Reinigungen des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ berücksichtigt.

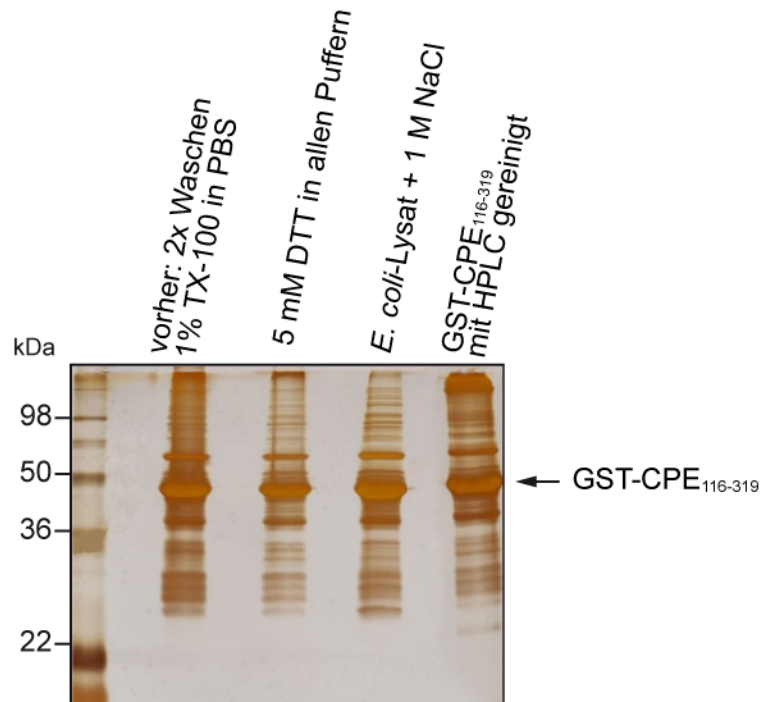


Abbildung 13: Reduzierung der unspezifischen Bindungen bei der Reinigung des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsproteins.

Es wurden verschiedene Maßnahmen getestet, um die unspezifischen Bindungen von Proteinen aus dem *E.coli*-Rohextrakt während der Reinigung des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ zu reduzieren. Der Reinheitsgrad des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ wurde durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung überprüft.

3.1.5 1% Triton X-100 im Waschpuffer und ein Wechsel des Reaktionsgefäßes vor der Elution reduzieren unspezifisch-bindende Proteine aus dem Zelllysat

Für die Affinitätsreinigung wurde nur noch GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ verwendet, das durch das optimierte Reinigungsprotokoll, wie unter 3.1.4 beschrieben, gereinigt wurde. Auch bei der Durchführung der Affinitätsreinigung kommt es zu unspezifischen Bindungen von Proteinen aus dem eukaryotischen Zelllysat. Die Affinitätsreinigung wurde deshalb hinsichtlich der Reduzierung von unspezifischen Bindungen optimiert und die Effektivität der Maßnahmen anhand einer SDS-Gelelektrophorese der Elutionsfraktionen mit anschließender Silberfärbung beurteilt (Abbildung 14).

Durch die Inkubation des eukaryotischen Zelllysats mit GST-beladenem Säulenmaterial im Vorfeld der Affinitätsreinigung können Proteine aus dem Lysat entfernt werden, die unspezifisch an das Säulenmaterial und das GST-Affinitätspepitop binden. Das vorgereinigte Zelllysat wird dann bei der Affinitätsreinigung eingesetzt. Verglichen mit der herkömmlichen Durchführung der Affinitätsreinigung führte die Vorreinigung des NRC-Lysats zu keiner sichtbaren Reduzierung der unspezifisch bindenden Proteine. Hingegen führte die Überführung des Säulenmaterials vor der Elution in ein neues Reaktionsgefäß sowie die

Erhöhung der Konzentration an Triton X-100 im Waschpuffer von 0,1% auf 1% zu einer Reduzierung unspezifisch bindender Proteine. Im Hinblick auf die Empfindlichkeit möglicher spezifischer Interaktionen gegenüber stringenteren Waschbedingungen wurden jedoch bei den nachfolgenden Experimenten nach der Inkubation des NRC-Lysats zwei Waschschr tte in Gegenwart von 1% Triton X-100 und ein Waschschr tt in Gegenwart von 0,1% Triton X-100 durchgeführt.

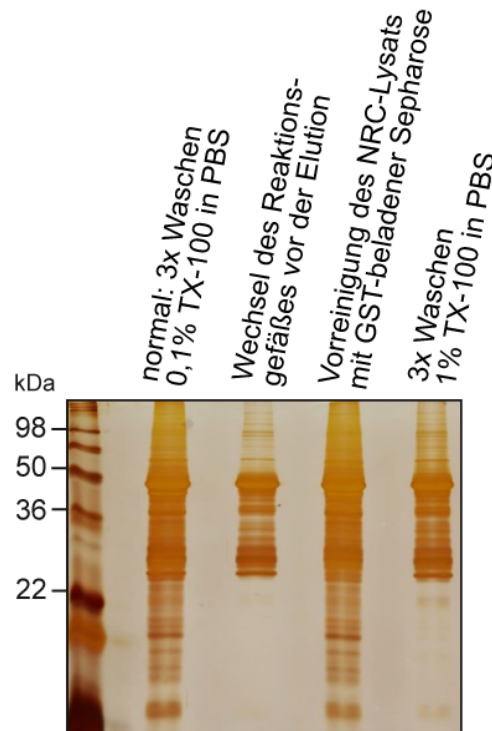


Abbildung 14: Reduzierung der unspezifischen Bindungen bei der Durchführung der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung.

Es wurden verschiedene Maßnahmen getestet, um unspezifische Bindungen von Proteinen aus dem eukaryotischen Zelllysate während der Durchführung der Affinitätsreinigung zu reduzieren. Die Effektivität der Maßnahmen wurde durch SDS-Gelelektrophorese der Elutionsfraktionen mit anschließender Silberfärbung überprüft.

3.2 Spezifische Anreicherung von Proteinen durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung

3.2.1 Claudin-1, -3, -4, -5 und -7 wurden durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereichert

Das Ziel der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung war es, verschiedene Claudine parallel anzureichern und über die spezifische Anreicherung von Claudinen eine Isolierung von Proteinen, die mit Claudinen assoziiert sind, zu ermöglichen. Da es sich dabei um eine Ko-Affinitätsreinigung handelte, musste zunächst sichergestellt werden, dass eine

Anreicherung von Claudinen durch das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ möglich war. Die spezifische Anreicherung der Claudine wurde durch Western Blot-Analysen überprüft. Dafür standen Antikörper gegen Claudin-1, -3, -4, -5 und -7 zur Verfügung. Der Fokus des ersten Teils der Western Blot-Analyse wurde auf Claudin-3, -4 und -7 gelegt, von denen gezeigt wurde, dass sie direkt mit CPE interagieren (Fujita et al., 00).

Die Western Blot-Analyse zeigte, dass Claudin-3, -4 und -7 spezifisch angereichert wurden (Abbildung 15a, b, c).

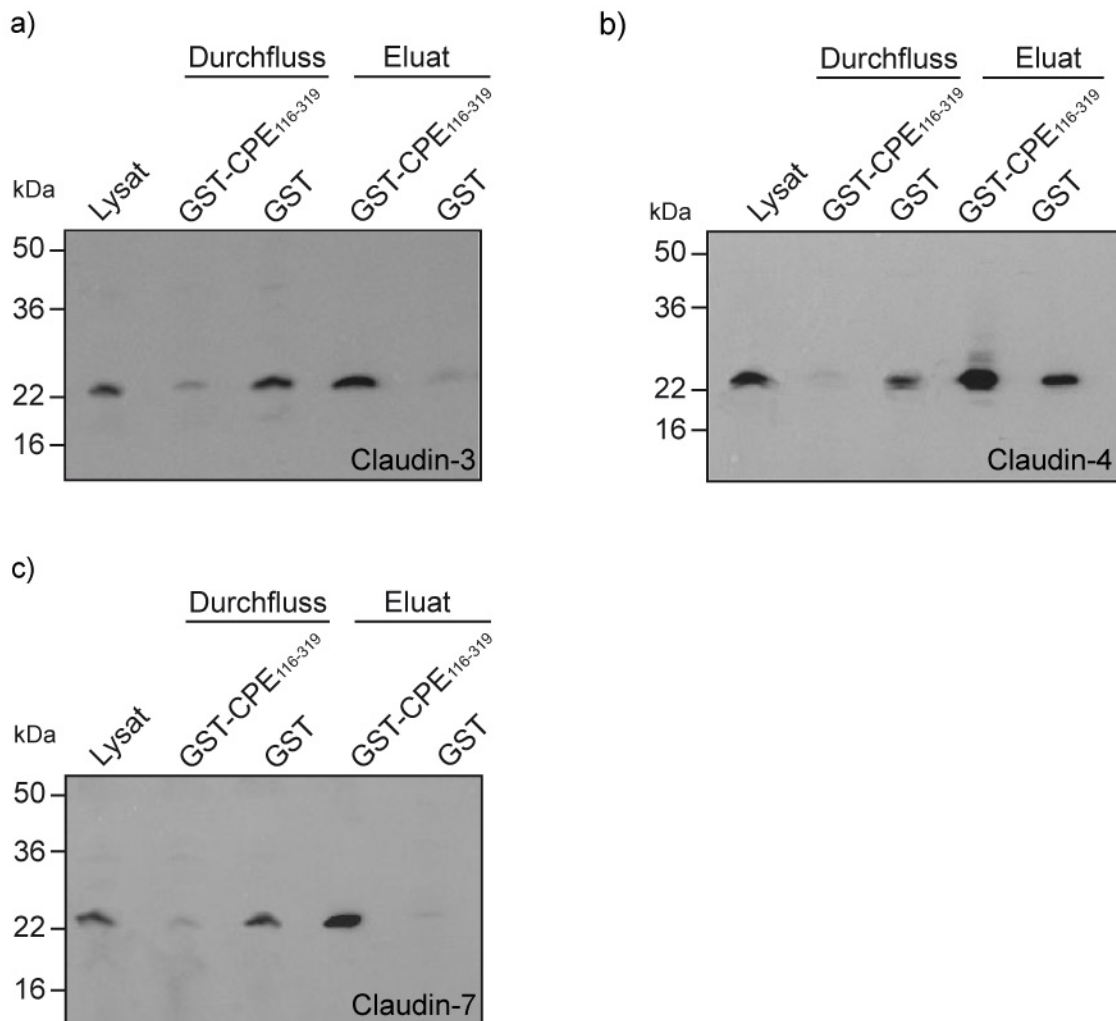


Abbildung 15: Nachweis der spezifischen Anreicherung von Claudin-3, -4 und -7 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung in NRC-Zellen.

Anhand von Western Blots wurde analysiert, inwieweit Claudin-3 (a), -4 (b) und -7 (c) durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereichert wurden.

Eine densitometrische Quantifizierung der Blots ergab, dass die Durchflussfraktionen des GST-Affinitätsreagents mehr als 40% der Mengen von Claudin-3, -4 und -7 (bezogen auf die detektierte Menge des jeweiligen Claudins im Lysat) enthielten, während die entsprechende Menge in den GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Durchflussfraktionen bei $\leq 10\%$ lag. Der Anreicherungsfaktor

(Verhältnis der Claudinmengen von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ dividiert durch GST-Kontrolle in den Eluaten) war für Claudin-3 und -7 größer als 40 und lag für Claudin-4 bei 4.

Neben der Interaktion verschiedener Claudine mit CPE wurde durch Fujita et al. beschrieben, dass CPE nicht an Claudin-1 und -5 bindet (Fujita et al., 00). Die Western Blot-Analyse zeigte, dass es durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung möglich war, sowohl Claudin-1 als auch Claudin-5 spezifisch anzureichern (Abbildung 16a, b).

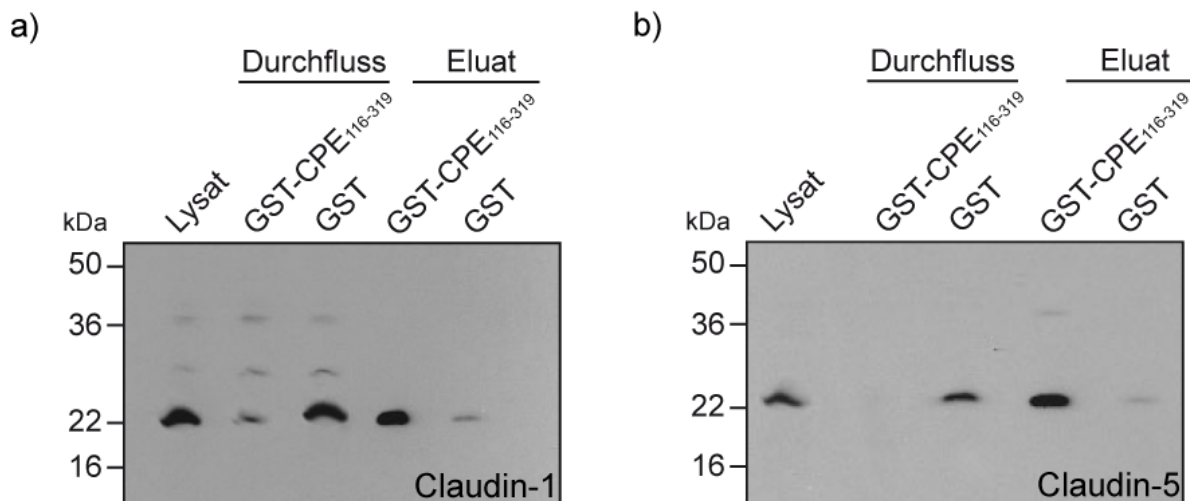


Abbildung 16: Nachweis der spezifischen Anreicherung von Claudin-1 und -5 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung in NRC-Zellen.

Die spezifische Anreicherung von Claudin-1 (a) und -5 (b) durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurde durch Western Blots analysiert.

Die Menge von Claudin-1 und -5 betrug, bezogen auf das Lysat, in den Durchflussfraktionen des GST-Affinitätssepitops mehr als 60% und lag in den GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Durchflussfraktionen bei $\leq 10\%$. Der Anreicherungsfaktor war für Claudin-1 und -5 größer als 40.

Durch die Affinitätsreinigung wurden neben Claudinen, die mit CPE interagieren, auch Claudine angereichert, von denen in der Literatur gezeigt wurde, dass sie nicht an CPE binden. Daraus ist zu schließen, dass eine Ko-Anreicherung von Proteinen möglich war, die nicht direkt an CPE binden.

3.2.2 Spezifische Anreicherung von Claudinen durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung in Gehirnkapillarendothelzellen

Gehirnkapillarendothelien sind spezialisierte Epithelien, die für die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sind. Die *tight junctions* von Gehirnkapillarendothelzellen unterscheiden sich von denen der Epithelzellen in der Zusammensetzung der Claudine. Aus der Literatur ist bekannt, dass neben Claudin-5 auch Claudin-3 und -1 in

Gehirnkapillarendothelzellen exprimiert werden (Wolburg et al., 03). Im Hinblick auf die mit einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke verbundenen Krankheiten sind Interaktionen von Claudin-5, -3 und -1 besonders interessant. Claudin-5 wird in NRC-Zellen relativ gering exprimiert, wohingegen für die Gehirnkapillarendothelzellen hCMEC/D3 eine gute Claudin-5-Expression beschrieben wurde (Weksler et al., 05). Aus diesem Grund wurde die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung auch mit dem Zelllysate von hCMEC/D3-Zellen durchgeführt und durch Western Blots-Analyse überprüft, ob Claudine spezifisch angereichert wurden. Da Claudin-4 und -7 nicht in den *tight junctions* der Blut-Hirn-Schranke vorkommen (Hawkins et al., 04), wurden ausschließlich Antikörper gegen Claudin-1, -3 und -5 eingesetzt.

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung mit Gehirnkapillarendothelzellen wurde Claudin-1 spezifisch angereichert, da es im GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Eluat und nicht im Eluat der GST-Kontrolle nachgewiesen wurde (Abbildung 17a). In der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Durchflussfraktion wurde kein Claudin-1 detektiert, dagegen enthielt die GST-Durchflussfraktion noch 70% der ursprünglich im Zelllysate vorhandenen Menge von Claudin-1. Claudin-5 konnte durch die Affinitätsreinigung unter Verwendung von Gehirnkapillarendothelzellen nicht angereichert werden, da es ausschließlich im Lysat und in den beiden Durchflussfraktionen detektiert wurde (Abbildung 17b). Claudin-3 wurde weder im Zelllysate noch in den anderen Fraktionen detektiert (Daten nicht gezeigt).

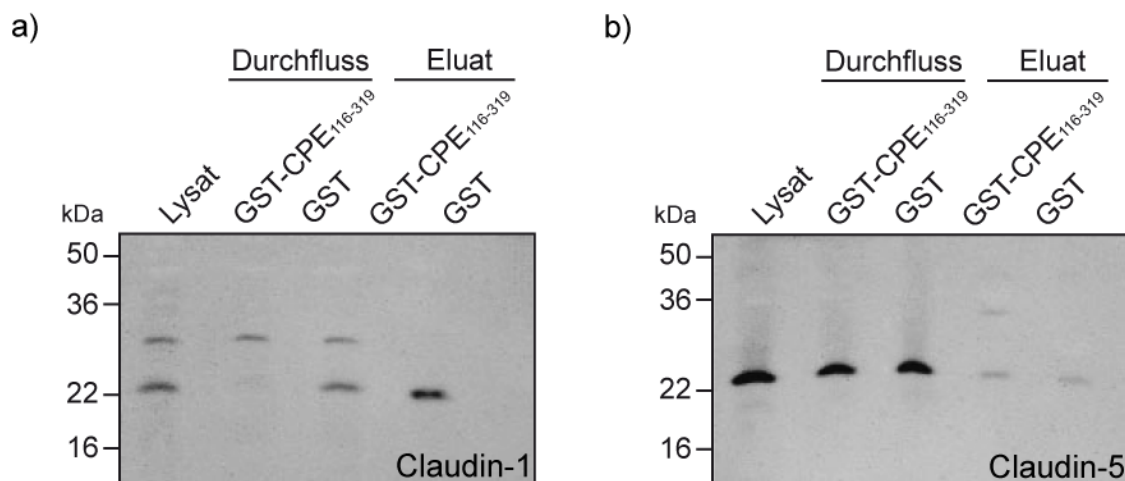


Abbildung 17: Nachweis der spezifischen Anreicherung von Claudin-1 und -5 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung unter Verwendung von hCMEC/D3-Zellen.

Anhand von Western Blots wurde analysiert, ob Claudin-1 (a) und -5 (b) durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung unter Verwendung von Gehirnkapillarendothelzellen (hCMEC/D3) angereichert wurden.

3.2.3 Anreicherung von weiteren *tight junction*-Proteinen durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung

Neben den Claudinen sind Occludin, ZO-1 und JAM-A wichtige Komponenten der *tight junctions*. Die Charakterisierung der NRC-Zellen zeigte, dass Occludin in diesen Zellen nur sehr schwach exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde anhand von Western Blots analysiert, ob ZO-1 und JAM-A durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereichert wurden.

Obwohl ZO-1 eine molekulare Masse von 195 kDa hat, wurden mit dem ZO-1-Antikörper ausschließlich Banden im Bereich zwischen 50 und 70 kDa detektiert, deren Auftreten vermutlich auf Proteolyse zurückzuführen ist. ZO-1 wurde durch die Affinitätsreinigung nicht spezifisch angereichert; die vermutlichen Abbauprodukte wurden ausschließlich im Lysat sowie in den Durchflussfraktionen des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und der GST-Kontrolle nachgewiesen (Abbildung 18a). JAM-A, das eine molekulare Masse von 33 kDa hat, wurde durch die Affinitätsreinigung nicht angereichert, da es lediglich im Lysat und in beiden Durchflussfraktionen gefunden wurde (Abbildung 18b). Es fiel jedoch auf, dass die obere der beiden vom JAM-A-Antikörper detektierten Banden (36-41 kDa) in der Durchflussfraktion des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ verglichen mit der Durchflussfraktion der GST-Kontrolle und dem Zelllysate reduziert wurde.

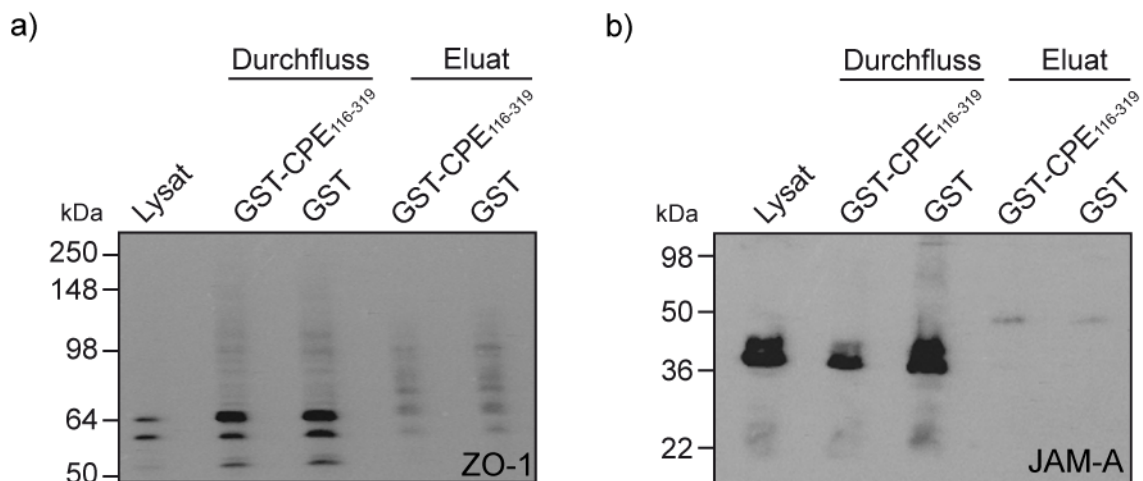


Abbildung 18: Anreicherung von ZO-1 und JAM-A durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung. Anhand von Western Blots wurde analysiert, ob durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung ZO-1 (a) und JAM-A (b) angereichert wurden. ZO-1 hat eine molekulare Masse von 195 kDa und JAM-A von 33 kDa. Der JAM-A-Antikörper detektiert Banden im Bereich von 36-41 kDa.

3.3 Proteomanalyse der durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung gebundenen Proteine

Im Rahmen der Proteomanalyse wurden die durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung gebundenen Proteine durch Tandemmassenspektrometrie identifiziert und analysiert (Abbildung 19a). Die quantitative Diskriminierung von Proteinen, die unspezifisch an das GST-Affinitätsseptop gebunden haben, sollte über die metabolische Markierung der Proteine mit stabilen Isotopen (SILAC) erfolgen. Dafür wurden das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und das GST-Affinitätsseptop der Kontrolle während der Affinitätsreinigung mit Lysaten von Zellen inkubiert, deren Kulturmedien unmarkierte [¹²C]- bzw. isotonenmarkierte [¹³C]-Aminosäuren enthielten. Um einen möglichst hohen Markierungsgrad der Proteine zu erreichen, wurden die in der Zellkultur essentiellen Aminosäuren Lysin und Arginin verwendet (Ong et al., 02). Für die massenspektrometrische Analyse wurden das Eluat des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und der GST-Kontrolle im Verhältnis von 1:1 vereinigt und die Proteine durch eine 1D-SDS-Gelelektrophorese separiert. Die Gelspur wurde in schmale Stücke zerschnitten (Abbildung 19b), die Proteine jeder Fraktion durch Trypsin gespalten und die Peptide durch Tandemmassenspektrometrie analysiert.

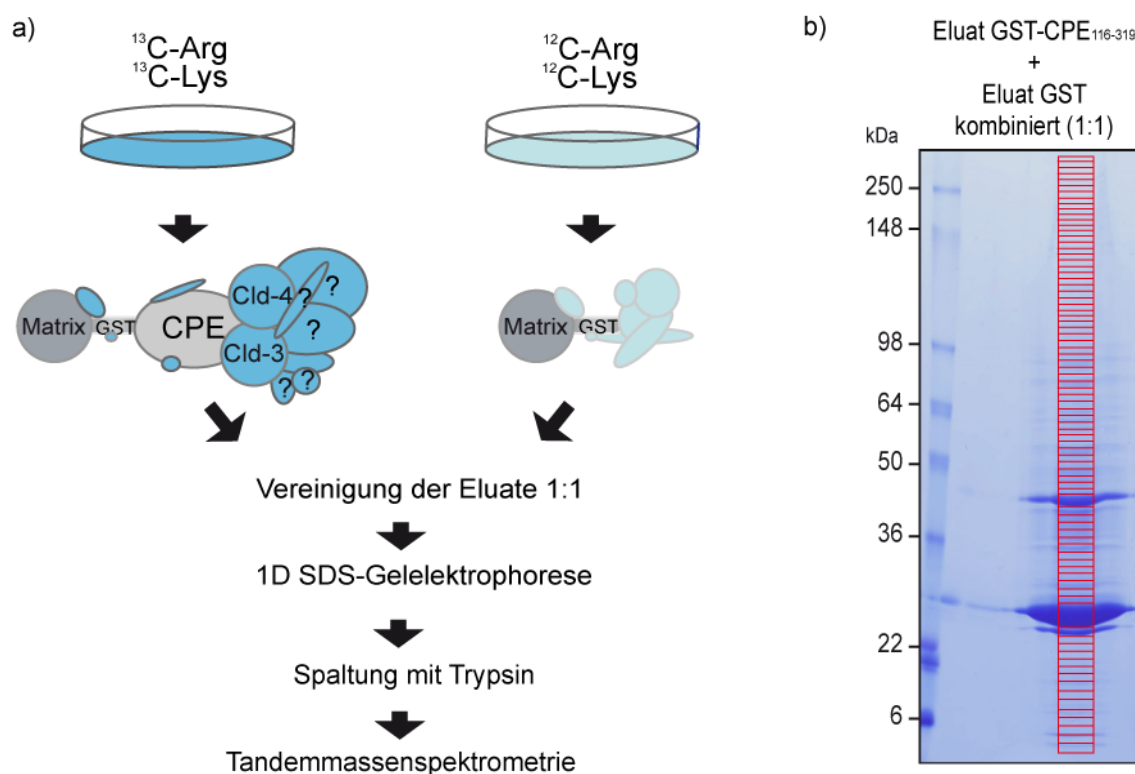


Abbildung 19: Proteomanalyse der durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung gebundenen Proteine.

a) Schematische Darstellung des Ablaufs der Proteomanalyse. b) 1D-SDS-Polyacrylamidgel, durch das die Proteine der kombinierten Eluate des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und des GST-Affinitätsseptops separiert wurden, und das für die tryptische Spaltung der Proteine im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse zerschnitten wurde.

Es wurden insgesamt drei unabhängige Affinitätsreinigungen (A, B und C) durchgeführt, deren gebundene Proteine anschließend durch Massenspektrometrie analysiert wurden. Von den drei Affinitätsreinigungen wurde ein Ansatz mit einer umgekehrten Markierung durchgeführt, d. h. bei einer Affinitätsreinigung wurde zu dem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ das isotope markierte [¹³C]-Zelllysate gegeben, während bei den beiden anderen Affinitätsreinigungen das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit dem unmarkierten [¹²C]-Zelllysate inkubiert wurde. Die Parameter für die Durchführung der drei Affinitätsreinigungen sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Von den durch die Affinitätsreinigung A gebundenen Proteinen wurden 45% prokaryotischen Spezies zugeordnet. Durch die Verwendung des gereinigten GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bei der Affinitätsreinigung B und C wurde dieser Anteil auf 20% gesenkt.

Tabelle 22: Parameter der drei unabhängigen GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigungen A, B und C.

	A	B	C
Form des Köder-Proteins	GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ im <i>E. coli</i> -Rohextrakt	gereinigtes GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉	gereinigtes GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉
metabolische Markierung des eingesetzten Zelllysats	Inkubation des GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ mit unmarkiertem [¹² C]-Zelllysate	Inkubation des GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ mit unmarkiertem [¹² C]-Zelllysate	Inkubation des GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉ mit isotope markiertem [¹³ C]-Zelllysate

3.3.1 In Gegenwart von isotope markierten Aminosäuren kultivierte NRC-Zellen zeigen keine morphologischen Unterschiede

Voraussetzung für eine aussagekräftige Anwendung der SILAC-Methode war, dass die metabolische Inkorporation der isotope markierten Aminosäuren zu keinen weiteren Unterschieden zwischen den beiden Zellpopulationen führte.

Verglichen mit NRC-Zellen, deren Kulturmedium unmarkierte [¹²C]-Aminosäuren enthielt, zeigten NRC-Zellen, deren Kulturmedium isotope markierte [¹³C]-Aminosäuren zugesetzt wurde, keine Veränderungen im Wachstumsverhalten. Darüber hinaus wurden keine morphologischen Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen festgestellt (Abbildung 20).

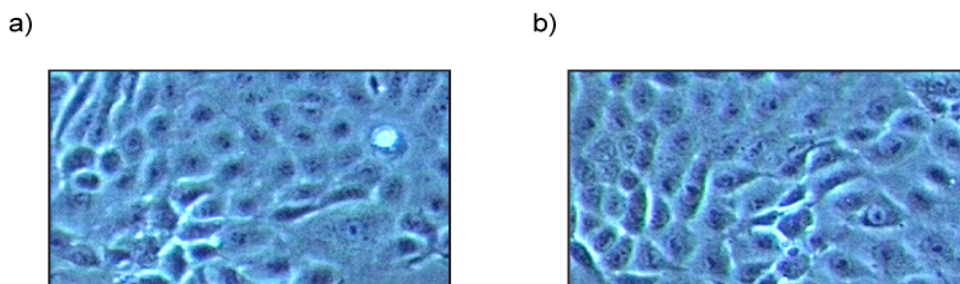


Abbildung 20: Vergleich von in Gegenwart verschiedener Aminosäuren kultivierten NRC-Zellen.

Es wurden zwei Populationen an NRC-Zellen parallel in Anwesenheit von unmarkierten [¹²C]-Aminosäuren (a) bzw. isotope markierten [¹³C]-Aminosäuren (b) kultiviert.

3.3.2 Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen (SILAC) erlaubt die quantitative Unterscheidung von spezifisch und unspezifisch bindenden Proteinen

Zunächst musste sichergestellt werden, dass durch die SILAC-Methode eine zuverlässige Diskriminierung von unspezifisch bindenden Proteinen gewährleistet war. Durch die Spaltung der Proteine mit der Protease Trypsin, die Peptidbindungen nach Lysin und Arginin schneidet, sollte jedes Peptid eine isotopenmarkierte Aminosäure enthalten (Ong und Mann, 05). Die Bestimmung des Markierungsgrads zeigte, dass die Proteine aus dem Lysat von Zellen, deren Kulturmedium isotopenmarkierte [^{13}C]-Aminosäuren zugesetzt wurde, diese Aminosäuren zu über 90% eingebaut hatten. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Eluate des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und des GST-Affinitätspeptids der Kontrolle vereinigt und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Durch den Einbau der [^{13}C]-Atome war jedes isotopenmarkierte Peptid aus dem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Eluat 6 Da schwerer als das unmarkierte [^{12}C]-Peptid aus dem GST-Kontroll-Eluat. Dies führte zu einer Verschiebung des Isotopenmusters des [^{13}C]-Peptids im Massenspektrum. Da sich die relativen Intensitäten der beiden MS-Signale proportional zur Menge der Peptide verhalten, wurden diese zueinander ins Verhältnis gesetzt (Gingras et al., 07). Über die Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses der Peptide (was im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Quantifizierung bezeichnet wird) wurde eine quantitative Aussage getroffen, inwieweit das dazugehörige Protein spezifisch durch das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ angereichert wurde oder ob es in beiden Eluaten zu finden war und damit unspezifisch gebunden hatte.

Abbildung 21a zeigt die Isotopenmuster eines Peptids der *ATP synthase subunit beta*, die durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung gebunden wurde. Es wurde sowohl das unmarkierte [^{12}C]-Peptid (m/z 488,28) als auch das isotopenmarkierte [^{13}C]-Peptid (m/z 491,29) detektiert. Die Quantifizierung der Peptide ergab, dass das [^{13}C]-Peptid und das [^{12}C]-Peptid in einem Verhältnis von 1:1 im Peptidgemisch vorlagen und das Protein damit unspezifisch gebunden wurde. Die Quantifizierung eines unmarkierten [^{12}C]-Peptids (m/z 910,97) und des entsprechenden isotopenmarkierten [^{13}C]-Peptids (m/z 913,96) Peptids von Claudin-3 ergab ein Verhältnis von 7,0 (Abbildung 21b), d. h. Claudin-3 wurde spezifisch durch die Affinitätsreinigung angereichert.

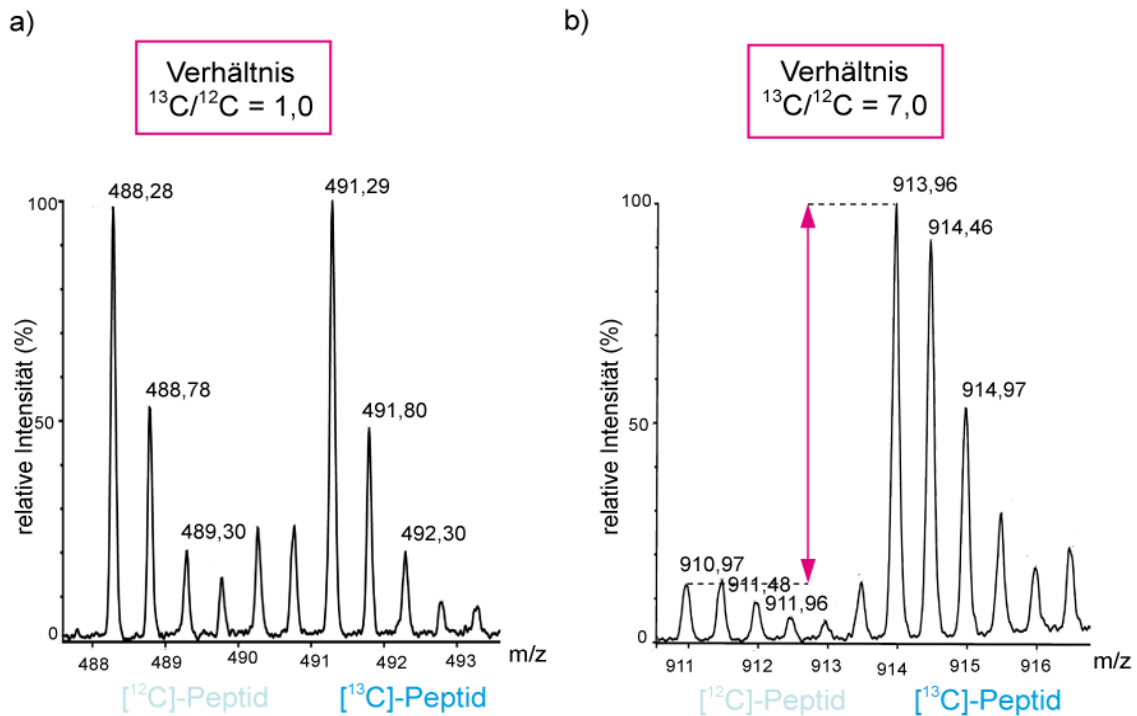


Abbildung 21: Isotopenmuster eines Peptids der ATP synthase subunit beta (a) und von Claudin-3 (b).

Die Quantifizierung der Peptide erfolgte über die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse.

Um eine Übersicht über die Verteilung der Quantifizierungswerte der gebundenen Proteine zu bekommen, wurde für einen Querschnitt an Proteinen das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis bestimmt, indem von jeder der drei Affinitätsreinigungen die Proteine jeder dritten Probenfraktion quantifiziert wurden. In die Quantifizierungen wurden nur eindeutig identifizierte Proteine einbezogen, d. h. dem Protein mussten mindestens zwei Peptide zugeordnet werden, die noch keinem anderen Protein zugeordnet wurden, und der MASCOT-score der Peptide musste über dem Signifikanzgrenzwert liegen. Die Standardabweichung war bei allen in dieser Arbeit aufgeführten Quantifizierungswerten kleiner als 20%.

Die Quantifizierungswerte des Großteils der gebundenen Proteine der Affinitätsreinigung A lagen über einen weiten Bereich zwischen 1,25 und 3,25 gestreut (Abbildung 22a). Die Quantifizierung der gebundenen Proteine von Affinitätsreinigung B zeigte, dass der Großteil der Proteine ein $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von 1 bis 1,25 aufwies (Abbildung 22b). Bei der Affinitätsreinigung C wurde für den Großteil der Proteine ein Quantifizierungswert von 0 bis 0,75 bestimmt (Abbildung 22c). Die stichprobenartige Quantifizierung der gebundenen Proteine zeigte, dass bei den Affinitätsreinigungen B und C der Großteil der Werte in einem engen Bereich lag und ein $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis um 1,0 aufwies während für einen kleinen Teil der Proteine hohe Quantifizierungswerte bestimmt wurden. Bei diesen beiden Affinitätsreinigungen war durch die SILAC-Methode eine Diskriminierung der unspezifisch bindenden Proteine möglich. Aufgrund der breiten Verteilung und der Höhe der Werte mussten die Quantifizierungswerte der Affinitätsreinigung A mit Vorsicht betrachtet werden.

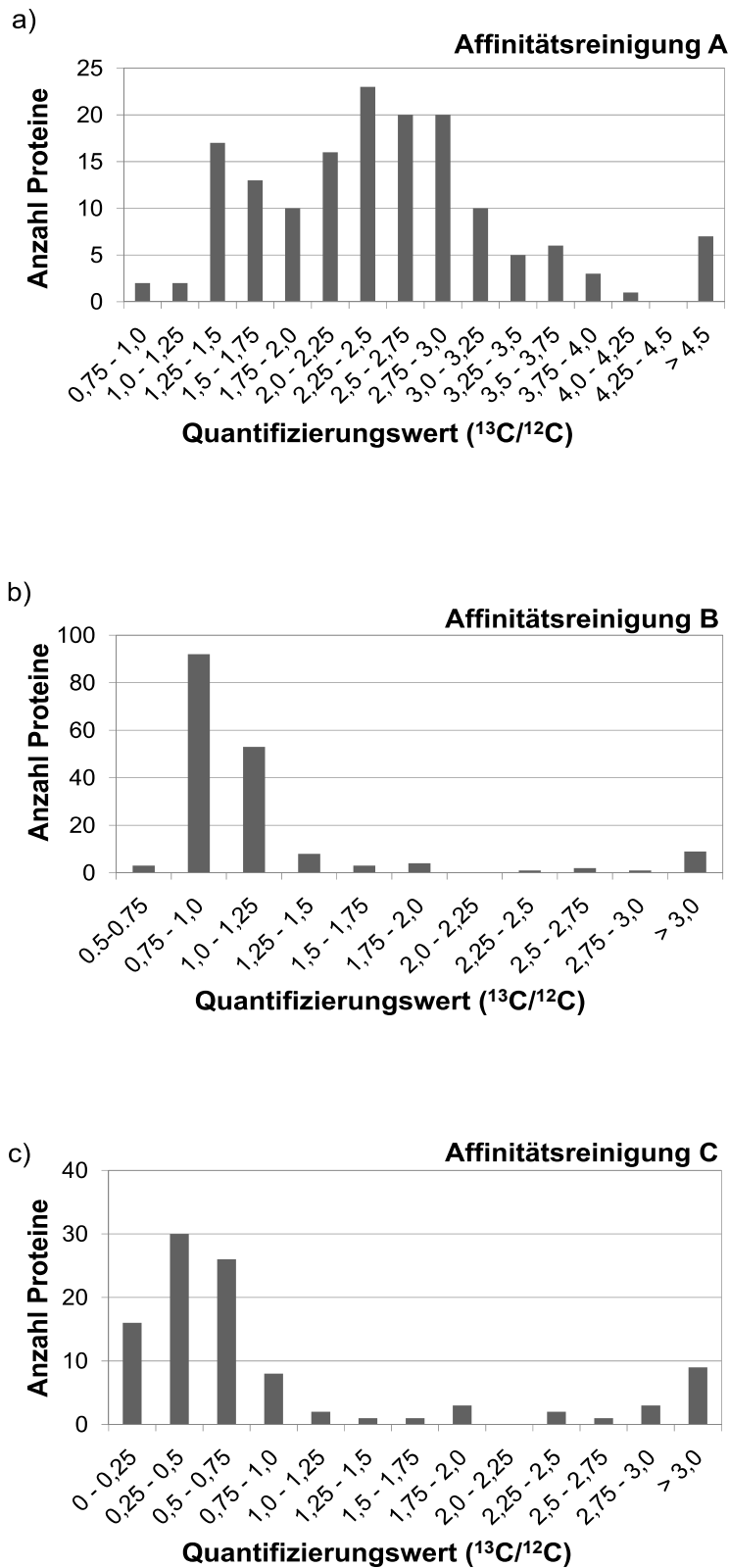


Abbildung 22: Verteilung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Quantifizierungswerte der drei Affinitätsreinigungen.
 Von jeder Affinitätsreinigung wurden die eindeutig identifizierten Proteine jeder dritten Probenfraktion quantifiziert.

3.3.3 Bestätigung der spezifische Anreicherung von Claudinen durch massenspektrometrische Analysen

Anhand von Western Blots wurde bereits gezeigt, dass Claudin-1, -3, -4, -5 und -7 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereichert wurden (3.2.1 und 3.2.2). In Tabelle 23 sind die Claudine zusammengefasst, die im Rahmen der massenspektrometrischen Analysen der durch die drei Affinitätsreinigungen gebundenen Proteine identifiziert wurden. Für die identifizierten Claudine sind die Zugangsnummern zur SwissProt-Datenbank (www.expasy.org) und die theoretischen molekularen Massen angegeben. Der MASCOT-score ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der richtig-positiven massenspektrometrischen Identifikation der Peptide (Perkins et al., 99). Die Peptide waren signifikant identifiziert, wenn der MASCOT-score über einem Wert von 46 lag. Des Weiteren sind die Anzahl der Peptide, die für das jeweilige Protein gefunden wurden, in der Tabelle angegeben. Der Mittelwert der ¹³C/¹²C-Verhältnisse der einzelnen Peptide eines Proteins wurde als Maß für die Spezifität der Anreicherung dieses Proteins bestimmt. Für jedes Claudin sind der MASCOT-score, die Anzahl der Peptide und das ¹³C/¹²C-Verhältnis für jede der drei Affinitätsreinigungen A, B und C aufgelistet.

Tabelle 23: Massenspektrometrische Identifizierung von Claudinen.

Für die durch Massenspektrometrie identifizierten Claudine sind die Zugangsnummern zur SwissProt-Datenbank und die theoretischen molekularen Massen angegeben. Ferner enthält die Tabelle für jedes Claudin von jeder der drei Affinitätsreinigungen A, B und C den MASCOT-score, die Anzahl der Peptide, die für das jeweilige Protein gefunden wurden, und den Mittelwert der ¹³C/¹²C-Verhältnisse der Peptide.

Protein	Zugangsnummer Swiss-Prot	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
Claudin-3	Q63400	23269	A 239	A 5	A 15,2
			B 298	B 6	B 14,1
			C 282	C 5	C 4,4
Claudin-4	O35054	22150	A 64	A 1	A 13,7
			B 68	B 1	B 7,6
			C 93	C 1	C 5,6
Claudin-7	Q9Z1L1	22416	A 51	A 1	A 13,0
			B n. i. ³	B n. i.	B n. i.
			C 104	C 2	C 9,2
Claudin-1	P56745	22580	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 171	B 2	B 14,0
			C 101	C 1	C 11,0

Claudin-3 und -4 wurden durch alle drei Affinitätsreinigungen, Claudin-7 und Claudin-1 durch zwei der drei Affinitätsreinigungen gebunden und durch Massenspektrometrie eindeutig identifiziert. Claudin-5 oder weitere Claudine wurden durch die massenspektrometrische

³ nicht identifiziert

Analysen nicht gefunden. Die Quantifizierung ergab für alle Claudine in allen drei Affinitätsreinigungen hohe $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse, d. h. die Claudine wurden spezifisch angereichert.

Die spezifische Anreicherung der Claudine durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurde durch die massenspektrometrischen Analysen reproduzierbar bestätigt. Neben Claudin-3, -4 und -7 wurde mit Claudin-1 ein Claudin identifiziert, von dem bekannt ist, dass es nicht mit CPE interagiert. Des Weiteren wurden im Rahmen einer initialen GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung mit Caco-2-Zellen (Daten nicht gezeigt) neben Claudin-3 und -4 auch Claudin-2 und -6 durch die massenspektrometrische Analyse identifiziert. Da dieses Experiment ohne die SILAC-Methode durchgeführt wurde, liegen für die entsprechenden Claudine keine quantitativen Daten vor. Mit Claudin-2 wurde ein weiteres Claudin angereichert, für das beschrieben wurde, dass es nicht mit CPE interagiert. Damit wurde gezeigt, dass eine spezifische Ko-Anreicherung von Claudinen möglich war, und dass diese Claudin-Komplexe durch Massenspektrometrie reproduzierbar identifiziert werden konnten.

3.3.4 Massenspektrometrische Identifizierung bekannter *tight junction*-Proteine

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung gelang eine Ko-Anreicherung von Claudinen, die nicht an CPE binden. Unter den darüber hinaus identifizierten Proteinen galt besonderes Interesse jenen Proteinen, die in der Literatur bereits mit *tight junctions* in Verbindung gebracht wurden. In Tabelle 24 sind weitere *tight junction*-Proteine aufgelistet, die durch die Affinitätsreinigung gebunden und durch Massenspektrometrie identifiziert wurden.

ZO-1 ist auf der zytoplasmatischen Seite mit den *tight junctions* assoziiert und sorgt für die Verbindung der *tight junctions* mit dem Zytoskelett (Ebnet, 08). Die Bindung von ZO-1 durch die Affinitätsreinigung A konnte nicht reproduziert werden, da ZO-1 nicht in den Eluatn der Affinitätsreinigungen B und C identifiziert wurde. Die Quantifizierung von ZO-1 ergab ein $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von 2,0. Obwohl dieser Wert aussagt, dass um den Faktor 2 mehr ZO-1 durch das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ angereichert wurde als durch das GST-Affinitätsepitop der Kontrolle, ist eine spezifische Anreicherung von ZO-1 aufgrund der Verteilung der Quantifizierungswerte dieser Affinitätsreinigung (Abbildung 22a) eher unwahrscheinlich.

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurden mit Cingulin, Rock 1 und 2, Cdc42 und α -Actinin-4 Proteine gebunden, für die bereits eine Assoziation mit den *tight junctions* beschrieben wurde (Chen et al., 06; Furuse et al., 94; Rojas et al., 01; Walsh et al., 01). Die Quantifizierung dieser Proteine zeigte, dass die Bindung unspezifisch erfolgte. Aus der

Literatur sind allerdings auch keine Daten über eine Interaktion dieser Proteine mit Claudinen bekannt.

Tabelle 24: Massenspektrometrische Identifizierung bekannter *tight junction*-Proteine.

Protein	Zugangsnummer Swiss-Prot	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
ZO-1	Q07157	195340	A 95	A 2	A 2,0
			B n. i.	B n. i.	B n. i.
			C n. i.	C n. i.	C n. i.
Cingulin	P59242	136365	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 186	B 5	B 1,0
			C 48	C 2	C 0,4
Rho associated kinase (ROCK 1)	P70335	158171	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 188	B 3	B 1,2
			C n. i.	C n. i.	C n. i.
ROCK 2	Q28021	160699	A 172	A 4	A 2,2
			B 610	B 13	B 1,0
			C n. i.	C n. i.	C n. i.
Cdc42	Q90694	21259	A 196	A 3	A 3,2
			B 255	B 5	B 1,2
			C n. i.	C n. i.	C n. i.
α-Actinin-4	P57780	104911	A 1443	A 27	A 3,0
			B 1151	B 21	B 0,8
			C 1895	C 38	C 0,3

3.3.5 Quantifizierungen reproduzierbar gebundener Proteine

Durch die drei Affinitätsreinigungen A, B und C wurden 498, 1085 bzw. 343 verschiedene Proteine gebunden und identifiziert (Abbildung 23). Die vollständigen Proteinlisten der drei Affinitätsreinigungen sind dem Anhang zu entnehmen (8.1, 8.2, 8.3).

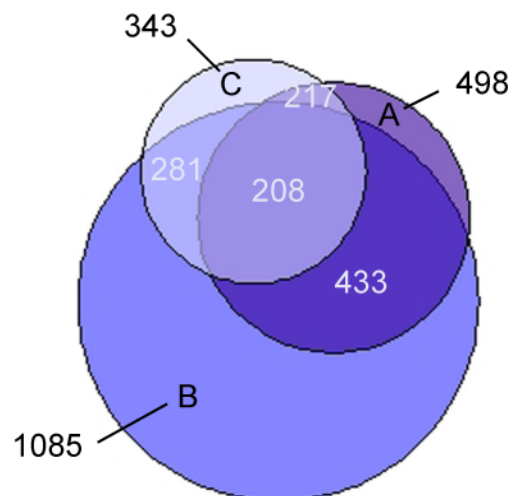


Abbildung 23: Anzahl der durch die drei Affinitätsreinigungen gebundenen Proteinen.

Das Schaubild zeigt die Anzahl der Proteine, die durch die drei Affinitätsreinigungen A, B und C gebunden wurden und wieviele dieser Proteine reproduzierbar gebunden wurden.

433 Proteine, die durch die Affinitätsreinigung A gebunden wurden, wurden auch durch die Affinitätsreinigung B gebunden. Durch die Affinitätsreinigungen A und C wurden 217 und durch die Affinitätsreinigungen B und C 281 Proteine reproduzierbar gebunden. 208 Proteine wurden in allen drei Ansätzen identifiziert.

Es wurde bereits gezeigt, dass durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung sowohl eine Anreicherung von CPE-bindenden Claudinen als auch eine Ko-Anreicherung von Claudinen gelang, die nicht mit CPE interagieren (3.3.3). Es stellte sich die Frage, ob über die Claudine noch weitere Proteine spezifisch angereichert wurden. Daher wurden für Proteine, die durch mindestens zwei unabhängige Affinitätsreinigungen gebunden wurden, die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse bestimmt. Proteine, für die ein hohes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ermittelt wurde, stellten potentielle Interaktionspartner der Claudine dar oder könnten in Komplexe integriert sein, die mit Claudinen assoziiert waren. Aufgrund der Verteilungen der Quantifizierungswerte der drei Affinitätsreinigungen (3.3.2) wurden von der Affinitätsreinigung A und von den Affinitätsreinigungen B und C nur die Proteine als spezifisch angereichert betrachtet, deren Quantifizierungswerte größer als 4,0 bzw. 1,5 waren.

Die Quantifizierung ergab, dass 35 der reproduzierbar angereicherten Proteine auch reproduzierbare $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse aufwiesen. Diese Proteine wurden anhand ihrer Lokalisation in der Zelle klassifiziert (Abbildung 24).

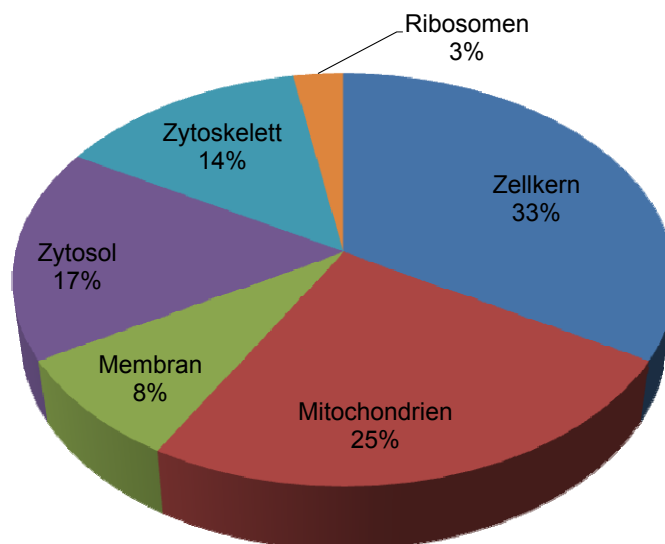


Abbildung 24: Einteilung der reproduzierbar spezifisch angereicherten Proteine nach ihrer zellulären Lokalisation.

Die Mehrzahl der durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Proteine sind im Kern lokalisiert (33%). Ein Großteil dieser Proteine waren RNA-Polymerasen, deren Quantifizierungen hohe reproduzierbare ¹³C/¹²C-Verhältnisse ergaben (Tabelle 25).

Tabelle 25: Spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die im Zellkern lokalisiert sind.

Die spezifische Anreicherung der farblosmarkierten Proteine wurde nicht reproduziert.

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
Ran-binding protein 2	Q9ERU9	340877	A 440	A 8	A 7,6
			B 347	B 6	B 5,5
			C 556	C 11	C 2,8
Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein (NMES 1)	Q5RK28	9578	A 55	A 1	A 4,7
			B 55	B 1	B 2,3
			C 143	C 3	C 1,7
Polymerase delta- interacting protein 2	Q9Y2S7	42007	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 165	B 3	B 2,9
			C 206	C 4	C 3,3
Nuclear RNA export factor 1	Q9UBU9	70139	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 149	B 3	B 2,0
			C 58	C 1	C 2,9
DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide	Q6QN04	7640	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 71	B 2	B 2,2
			C 221	C 4	C 5,9
DNA-directed RNA polymerases I, II, III 17.1 kDa polypeptide	P52434	17001	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 205	B 3	B 4,5
			C 232	C 4	C 5,8
DNA-directed RNA polymerase II subunit I	Q32P73	14480	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 86	B 1	B 5,3
			C 157	C 2	C 11,1
DNA-directed RNA polymerase II 33 kDa polypeptide	P97760	31292	A 154	A 3	A 8,9
			B 302	B 5	B 5,9
			C 472	C 7	C 10,4
DNA-directed RNA polymerase II 16 kDa polypeptide	O15514	16301	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 134	B 2	B 6,6
			C 391	C 7	C 8,8
DNA-directed RNA polymerase II 140 kDa polypeptide	P30876	133811	A 668	A 15	A 9,2
			B 928	B 21	B 6,8
			C 2166	C 38	C 10,0
DNA-directed RNA polymerase II largest subunit	P24928	217069	A 1244	A 24	A 10,1
			B 1954	B 40	B 7,4
			C 2952	C 55	C 7,6
DNA-directed RNA polymerase II subunit J	P52435	13285	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 154	B 3	B 6,8
			C 199	C 5	C 7,6

Fortsetzung Tabelle 25

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
Proliferating cell nuclear antigen	P17918	28766	A n. i. B 350 C 49	A n. i. B 8 C 1	A n. i. B 1,2 C 2,3
RuvB-like 1	Q9Y265	50196	A n. i. B 268 C 386	A n. i. B 4 C 7	A n. i. B 0,8 C 2,2
Importin beta-1 subunit	Q14974	97108	A n. i. B 669 C 386	A n. i. B 14 C 2	A n. i. B 0,9 C 2,2

Des Weiteren wurde *Ran-binding protein 2* (RanBP2) durch alle drei Affinitätsreinigungen mit hohen Quantifizierungswerten angereichert. RanBP2 ist an der zytoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert und dort am gerichteten Transport von Zellkernproteinen beteiligt (Mahajan et al., 97). Über das *normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein* (NMES1) ist wenig bekannt, es wurden lediglich anhand von *microarray*-Analysen veränderte Expressionsniveaus von *NMES1* im Zusammenhang mit verschiedenen Karzinomen gefunden (Riggs et al., 05; Sova et al., 06; Zhou et al., 02). Die Proteine *proliferating cell nuclear antigen*, *ruvB-like 1* und *importin beta-1 subunit* wurden zwar durch zwei unabhängige Affinitätsreinigungen angereichert, allerdings wichen die beiden Quantifizierungswerte voneinander ab, so dass von einer spezifischen Anreicherung nicht auszugehen war.

Die zweitgrößte Gruppe der durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Proteine umfasste Proteine der Mitochondrien (25%). Der Großteil dieser Proteine ist mit der Innen- oder Außenmembran der Mitochondrien assoziiert (*ATPase family AAA domain-containing protein 3*, *isocitrate dehydrogenase subunit beta*, *NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex*, *sulfide:quinone oxidoreductase*, *ATP synthase subunit alpha*) (Tabelle 26). *Carnitine O-palmitoyltransferase* vermittelt den Transport langkettiger Fettsäuren durch die Membran ins Innere der Mitochondrien (Gobin et al., 03).

Tabelle 26: Spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die in den Mitochondrien lokalisiert sind.

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
ATPase family AAA domain-containing protein 3	Q92511	66701	A 179 B 158 C 595	A 3 B 3 C 12	A 3,4 B 1,5 C 4,7
Carnitine O-palmitoyltransferase	P32198	88083	A n. i. B 407 C 433	A n. i. B 7 C 8	A n. i. B 1,6 C 2,7

Fortsetzung Tabelle 26

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
Pyrroline-5-carboxylate reductase	Q922W5	32353	A n. i. B 111 C 80	A n. i. B 2 C 1	A n. i. B 1,6 C 2,7
3-ketoacyl-CoA thiolase	P13437	41844	A n. i. B 596 C 131	A n. i. B 10 C 3	A n. i. B 1,8 C 4,7
NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex	Q62425	9321	A n. i. B 146 C 152	A n. i. B 4 C 3	A n. i. B 2,7 C 5,0
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	P29147	38177	A n. i. B 106 C 115	A n. i. B 2 C 2	A n. i. B 3,8 C 5,9
Sulfide:quinone oxidoreductase	Q9R112	50308	A n. i. B 1296 C 1055	A n. i. B 21 C 17	A n. i. B 4,4 C 6,3
DnaJ homolog subfamily A member 3	Q99M87	52410	A n. i. B 70 C 66	A n. i. B 1 C 1	A n. i. B 6,1 C 2,4
Trifunctional enzyme subunit alpha	Q64428	82461	A 399 B 1291 C 494	A 9 B 19 C 8	A 3,2 B 1,8 C 1,8
ATP Synthase subunit alpha	P15999	59717	A n. i. B 1735 C 1021	A n. i. B 27 C 19	A n. i. B 0,7 C 3,4

8% der spezifisch angereicherten Proteine sind in der Plasmamembran lokalisiert (Tabelle 27). Integrine sind transmembranale Rezeptormoleküle, die zum einen die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett der Zelle verbinden und zum anderen Signale aus dem extrazellulären Raum an das Zellinnere vermitteln. Integrine sind Heterodimere, die aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Das $\alpha_3\beta_1$ -Integrin ist der Rezeptor vieler Liganden wie Laminin und Fibronectin (Lubman et al., 00). Während die spezifische Anreicherung der α_3 -Untereinheit durch zwei Affinitätsreinigungen reproduziert wurde, wurde die β_1 -Untereinheit nur durch die Affinitätsreinigung B und mit einer geringen Spezifität gebunden.

Der *low-density lipoprotein receptor* (LDL-Rezeptor) ist in der Plasmamembran lokalisiert und übt eine wichtige Funktion bei der Regulation des Cholesterinstoffwechsels aus. Der LDL-Rezeptor vermittelt über Endocytose den Transport von Cholesterinestern in Form von Lipid-Protein-Partikeln vom Blut in die Zelle (Goldstein und Brown, 85).

Tabelle 27: Spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind.

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score		Anzahl Peptide		Verhältnis ¹³ C/ ¹² C	
Integrin-α_3	116671	Q62470	A	n. i.	A	n. i.	A	n. i.
			B	167	B	3	B	1,6
			C	95	C	2	C	2,6
Low-density lipoprotein receptor	P35952	96559	A	n. i.	A	n. i.	A	n. i.
			B	192	B	3	B	1,5
			C	58	C	1	C	3,7
Integrin-β_1	P49134	88436	A	149	A	3	A	2,3
			B	210	B	4	B	1,5
			C	n. i.	C	n. i.	C	n. i.

Proteine, die spezifisch angereichert wurden und im Zytosol lokalisiert sind, machten einen Anteil von 17% der durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung angereicherten Proteine aus (Tabelle 28). Dazu zählte das Protein *small ubiquitin-related modifier 1* (SUMO-1), das post-translational mit bestimmten Proteinen verknüpft wird. Dieser als Sumoylierung bezeichneter Prozess verändert die Funktion von Proteinen, indem Sequenzen, auf die bestimmte Interaktionen zurückzuführen sind, integriert bzw. blockiert werden oder indem die Konformation der Proteine modifiziert wird. Dies führt zu einer Veränderung der subzellulären Lokalisation, Stabilität oder Aktivität der Proteine (Johnson, 04). Die Sumoylierung wird durch das *SUMO-1-conjugating enzyme* UBC9 katalysiert, das ebenfalls spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung angereichert wurde (Schwarz et al., 98). Ferner wurde das *RanGTPase-activating protein* (RanGAP) angereichert, das zusammen mit RanBP2 am gerichteten Transport von Proteinen aus dem Zellkern beteiligt ist (Saitoh et al., 97). Sphingosinkinase 2 ist ein zytosolisches Protein, das sowohl im Kern als auch an der Zellmembran lokalisiert ist (Ding et al., 07; Hait et al., 05). Eine wichtige Rolle spielt Sphingosinkinase 2 im Sphingolipid-Stoffwechsel, indem es die Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat katalysiert (Takuwa et al., 08). Darüber hinaus wurde *Dynein light chain 1* spezifisch angereichert. Dyneine sind aus zwei oder drei schweren Ketten und einer großen, unterschiedlichen Anzahl leichter Ketten zusammengesetzt. Dyneine sind für die Lokalisierung des Golgi-Apparats und den Vesikeltransport verantwortlich (Lacey und Haimo, 92). Die Hydrolase *peroxisome assembly factor 2* spielt vermutlich für den Import von Proteinen in die Peroxisomen eine Rolle (Tsukamoto et al., 95). Desmoplakin ist ein wichtiger Bestandteil der Desmosomen, über die die Intermediärfilamente benachbarter Zellen miteinander verbunden sind (Gallicano et al., 98). Desmoplakin wurde zwar durch zwei unabhängige Affinitätsreinigungen gebunden, allerdings ergab die Quantifizierung von Desmoplakin bei der Affinitätsreinigung C einen Wert von 0,3, so dass die Spezifität der Bindung nicht reproduzierbar war.

Tabelle 28: Spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die im Zytosol lokalisiert sind.

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
Small ubiquitin-related modifier 1 precursor (SUMO-1)	Q5E9D1	11550	A 45	A 1	A 8,4
			B 147	B 3	B 1,2
			C 152	C 3	C 5,2
SUMO-1-conjugating enzyme UBC9	P63283	17995	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 105	B 3	B 1,7
			C 102	C 2	C 3,3
Ran GTPase-activating protein 1 (RanGAP)	P46061	63576	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 420	B 6	B 1,8
			C 407	C 7	C 4,7
Sphingosine kinase 2 (SphK2)	Q9NRA0	69174	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 53	B 1	B 2,9
			C 59	C 1	C 3,6
Dynein light chain 1	P61285	10359	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 128	B 3	B 2,9
			C 248	C 5	C 3,3
Peroxisome assembly factor 2	P54777	104361	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 307	B 6	B 2,6
			C 60	C 1	C 3,4
Protein KIAA1967	Q8VDP4	102938	A 281	A 6	A 3,7
			B 613	B 12	B 2,7
			C 98	C 2	C 0,5
Desmoplakin	P15924	331569	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 591	B 12	B 3,0
			C 57	C 1	C 0,3
Cullin-1	Q13616	89622	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 97	B 2	B 1,1
			C 69	C 1	C 1,9
Prefoldin subunit 2	Q9UHV9	16638	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 52	B 1	B 0,8
			C 127	C 2	C 3,7

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung wurde eine Vielzahl der Untereinheiten des Tubulins spezifisch angereichert, die einen Anteil von 14% der angereicherten Proteine ausmachten (Tabelle 29). α - und β -Tubulin sind Hauptbestandteile der Mikrotubuli, in denen sie als Heterodimere vorkommen. Die Mikrotubuli bestimmen die Lage der membranumschlossenen Zellorganelle und sorgen für den intrazellulären Transport (Desai und Mitchison, 97).

Tabelle 29: Spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die zum Zytoskelett gehören.

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
Tubulin alpha-1 chain	P68369	50104	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 63	B 1	B 1,9
			C 165	C 3	C 2,0
Tubulin beta-1 chain	P69893	49639	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 263	B 3	B 2,0
			C 363	C 5	C 2,3
Tubulin alpha-3/alpha-5 chain	P20363	49622	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 98	B 1	B 2,3
			C 69	C 1	C 2,7
Tubulin beta chain	P02554	49829	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 1457	B 22	B 2,5
			C 109	C 2	C 2,2
Tubulin beta-6 chain	Q922F4	50058	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 1238	B 6	B 3,8
			C 68	C 1	C 2,4

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung wurde das 60S ribosomal protein L23 spezifisch angereichert (Tabelle 30). Die spezifische Anreicherung eines weiteren ribosomalen Proteins (40S ribosomal protein S27-like protein) wurde nicht reproduziert.

Tabelle 30: Spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die in den Ribosomen lokalisiert sind.

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
60S ribosomal protein L23	Q3T057	14813	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 199	B 4	B 1,6
			C 383	C 8	C 4,0
40S ribosomal protein S27-like protein	Q71UM5	9340	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 53	B 1	B 1,0
			C 57	C 1	C 3,9

Ausschließlich durch die Affinitätsreinigung C wurden die ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) 4 und 6 spezifisch angereichert, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind (Tabelle 31). ARFs sind Bestandteile der Hülle von Transportvesikeln und an der Vesikelknospung und der Enthüllung von Vesikeln beteiligt (Orcl et al., 93).

Tabelle 31: Spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung angereicherte Proteine, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind.

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Mr [Da]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
ADP-ribosylation factor 4	P61750	20253	A 136	A 3	A 3,7
			B 155	B 3	B 0,8
			C 227	C 5	C 3,3
ADP-ribosylation factor 6	P26990	19952	A n. i.	A n. i.	A n. i.
			B 406	B 6	B 1,0
			C 166	C 2	C 3,0

3.4 Verifizierung der Interaktion mittels CPE angereicherter Proteine mit Claudinen

Neben den Claudinen wurde durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung noch eine Vielzahl weiterer Proteine reproduzierbar angereichert, für die im Rahmen der SILAC-Quantifizierung hohe ¹³C/¹²C-Verhältnisse bestimmt wurden. Einerseits stellten diese Proteine potentielle Interaktionspartner der Claudine bzw. Komponenten von Komplexen dar, die mit Claudinen assoziiert sind. Andererseits bestand aber auch die Möglichkeit, dass Proteine, die laut ¹³C/¹²C-Verhältnis spezifisch durch die Affinitätsreinigung angereichert wurden, keine physiologische Relevanz hinsichtlich der Claudine hatten. Ob Interaktionen mit Claudinen in der Zelle in der Tat vorkommen, konnte nur durch alternative Methoden überprüft werden. Proteine, die im Kern und in den Mitochondrien lokalisiert sind, wurden für weiterführende Untersuchungen außer Acht gelassen, da eine Interaktion mit Claudinen *in vivo* unwahrscheinlich erschien. Dagegen stellten Proteine, die im Zytosol und in der Plasmamembran lokalisiert sind, interessante potentielle Interaktionspartner der Claudine dar. Für die zytosolischen Proteine SUMO-1 und Sphingosinkinase 2 sowie das Membranprotein Integrin- α_3 wurden daher weiterführende Untersuchungen durchgeführt.

3.4.1 Charakterisierung der Anreicherung von SUMO-1

SUMO-1 ist ein 14 kDa großes Protein, das post-translational mit zahlreichen Proteinen kovalent verknüpft wird. Neben den meist nukleären Sumoylierungssubstraten sind auch zwei plasmamembranständige Glukosetransporter identifiziert worden, die mit SUMO-1 konjugiert sind (Giorgino et al., 00). Aus diesen Gründen erschien eine nähere Charakterisierung der Interaktion von Claudinen und SUMO-1 sinnvoll.

Zunächst wurde die spezifische Anreicherung von SUMO-1 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung anhand von Western Blots analysiert. Die unmodifizierte

Form von SUMO-1, die eine molekulare Masse von 14 kDa hat, wurde durch die Affinitätsreinigung nicht spezifisch angereichert, da ein SUMO-1-Signal nur im Zelllysat und in den Durchflussfraktionen des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und der GST-Kontrolle detektiert wurde (Abbildung 25a).

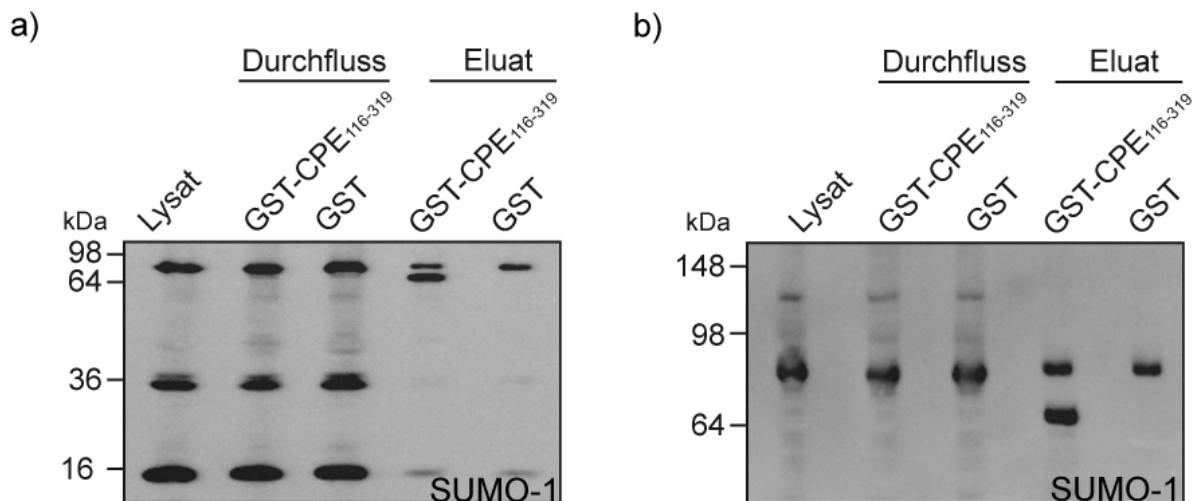


Abbildung 25: Nachweis der Anreicherung von SUMO-1 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung.

Durch Western Blot-Analyse wurde die spezifische Anreicherung von SUMO-1 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung überprüft. Dafür wurden die Proteine durch ein 15%iges (a) und ein 6%iges (b) SDS-Gel aufgetrennt.

Ein weiteres SUMO-1-Signal wurde bei einer molekularen Masse von 35 kDa detektiert. Da dieses vermutlich sumoylierte Protein ausschließlich im Lysat sowie in beiden Durchflussfraktionen nachgewiesen wurde, wurde es durch die Affinitätsreinigung nicht angereichert. Für eine genauere Analyse der höhermolekularen Banden wurden die Proben außerdem durch ein geringer prozentiges SDS-Gel aufgetrennt und anschließend durch Western Blots analysiert (Abbildung 25b). Ein weiteres SUMO-1-Signal wurde bei einer molekularen Masse von 70 kDa detektiert, das ausschließlich im Eluat des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ gefunden wurde. Ein SUMO-1-konjugiertes Protein, das eine molekulare Massen von 90 kDa hat, wurde sowohl im Eluat des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ als auch im Eluat der GST-Kontrolle mit gleicher Intensität nachgewiesen und wurde damit unspezifisch gebunden. Schließlich wurde bei 110 kDa im Lysat sowie in beiden Durchflussfraktionen ein SUMO-1-konjugiertes Protein detektiert, dass folglich nicht durch die Affinitätsreinigung angereichert wurde.

Die Western Blot-Analyse zeigte, dass ausschließlich ein SUMO-1-konjugiertes Protein mit einer molekularen Masse von ca. 70 kDa durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereichert wurde. Damit schieden die Claudine als Sumoylierungssubstrate von SUMO-1 aus, da auf dieser Höhe keine Claudine detektiert wurden. Eine andere Möglichkeit bestand darin, dass ein weiteres, mit SUMO-1-konjugiertes Protein in Wechselwirkung mit den Claudinen getreten war. Um dies zu überprüfen, wurde die Ko-Lokalisation von SUMO-1

mit Claudin-4 anhand von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass Claudin-4 (grün) vorwiegend in der Plasmamembran (Abbildung 26a) und SUMO-1 (rot) an der Kernmembran (Abbildung 26b) lokalisiert war. Eine Ko-Lokalisation von Claudin-4 mit dem potentiell sumoylierten Protein wurde nicht nachgewiesen, da weder Claudin-4 am Kern noch SUMO-1 an der Plasmamembran detektiert wurde (Abbildung 26c).

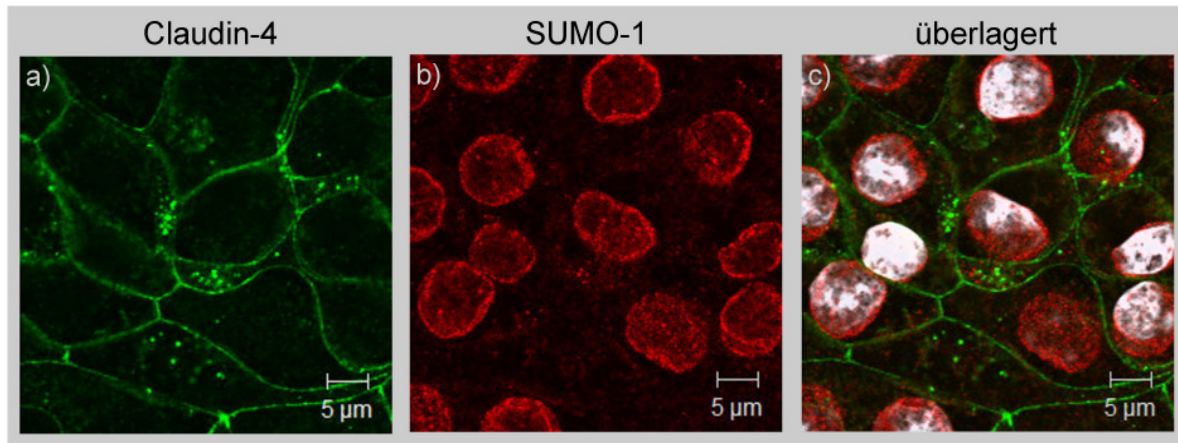


Abbildung 26: Analyse der Ko-Lokalisation eines potentiell sumoylierten Proteins mit Claudin-4 anhand von Immunfluoreszenzfärbungen.

NRC-Zellen wurden fixiert und die Ko-Lokalisation von Claudin-4 (grün) mit einem potentiell sumoylierten Protein analysiert.

Die Western Blot-Analyse zeigte, dass ein sumoyliertes Protein mit einer molekularen Masse von 70 kDa spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereichert wurde. Über die physiologische Relevanz dieses Proteins im Hinblick auf Claudine ließ sich keine Aussage treffen, da weder im Lysat noch in den beiden Durchflüssen ein Signal auf dieser Höhe detektiert wurde und auch über Immunfluoreszenzfärbungen keine Hinweise auf eine Interaktion des sumoylierten Proteins mit Claudinen gefunden wurde.

3.4.2 Charakterisierung der Anreicherung von Integrin- α_3

Integrine sorgen unter anderem für eine Verbindung der extrazellulären Matrix mit dem Zytoskelett der Zelle (Ziegler et al., 08). Da sowohl Integrine als auch Claudine transmembranale Zelladhäsionsproteine sind, wurde die potentielle Interaktion von Integrin- α_3 mit Claudinen weiterführend untersucht.

Die Spezifität der Anreicherung von Integrin- α_3 wurde anhand eines Western Blots überprüft. Integrin- α_3 hat eine molekulare Masse von 150 kDa. Der Western Blot zeigte, dass das Integrin- α_3 -Signal der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Elutionsfraktion sehr schwach war (Abbildung 27). Darüber hinaus wurden gleiche Mengen an Integrin- α_3 im Eluat des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und der

GST-Kontrolle gefunden und auch der Durchfluss des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ enthielt nicht weniger Integrin- α_3 als der der GST-Kontrolle. Aus diesem Grund wurde die spezifische Anreicherung von Integrin- α_3 im Western Blot nicht bestätigt, und es wurde von einer weiteren Verifizierung der Interaktion zwischen Integrin- α_3 und Claudinen abgesehen.

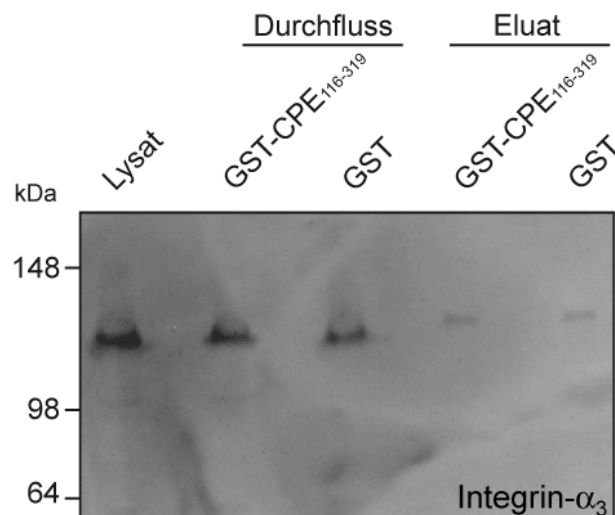


Abbildung 27: Nachweis der Anreicherung von Integrin- α_3 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung.

Die Anreicherung von Integrin- α_3 (150 kDa) durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurde anhand eines Western Blots analysiert.

3.4.3 Charakterisierung der Angreicherung von Sphingosinkinase 2

Die bisherigen Arbeiten über Sphingosinkinase 2 zeigten eine große Divergenz hinsichtlich der zellulären Lokalisation des Enzyms, da Sphingosinkinase 2 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma und an der Plasmamembran lokalisiert sein kann (Ding et al., 07; Hait et al., 05). Im Sphingolipid-Stoffwechsel katalysiert Sphingosinkinase 2 Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat (Takuwa et al., 08). Sphingosin-1-Phosphat ist ein Lipidmediator, der bei der Regulation einer Vielfalt zellulärer Prozesse wie der Anordnung des Zytoskeletts, der Zellbewegungen und der Angiogenese eine Rolle spielt (Donati und Bruni, 06; Hait et al., 05; Lee et al., 99). Lee et al. zeigten, dass Sphingosin-1-Phosphat an der chemotaxischen Migration von Endothelzellen und an der Integrität der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist (Lee et al., 06). Aus diesen Gründen erschien eine Charakterisierung der potentiellen Interaktion von Sphingosinkinase 2 mit Claudinen sinnvoll.

Die Anreicherung von Sphingosinkinase 2 (70 kDa) durch die Affinitätsreinigung wurde durch eine Western Blot-Analyse bestätigt, da Sphingosinkinase 2 im Eluat des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ nachgewiesen wurde (Abbildung 28). Obwohl Sphingosinkinase 2 auch im Eluat der GST-Kontrolle detektiert wurde, wurde von einer spezifischen Anreicherung von Sphingosinkinase 2 ausgegangen, da das Signal des Eluats des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ doppelt so stark war wie das der Kontrolle.

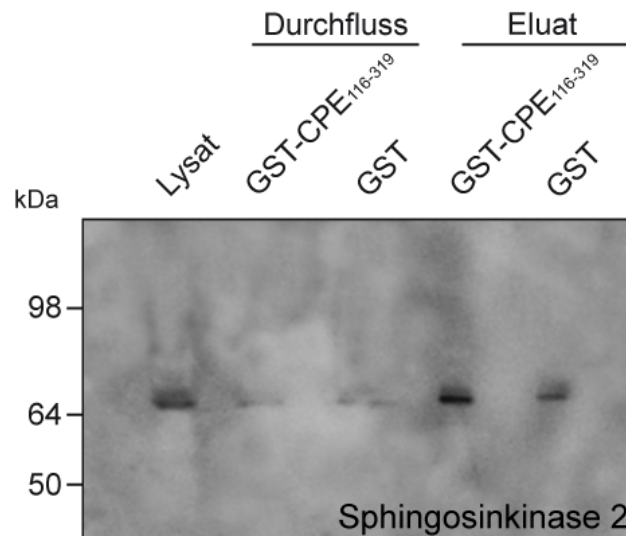


Abbildung 28: Nachweis der spezifischen Anreicherung von Sphingosinkinase 2 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung.

Die spezifische Anreicherung von Sphingosinkinase 2 (70 kDa) durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurde anhand eines Western Blots überprüft.

Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen wurde zudem analysiert, ob eine Ko-Lokalisation von Sphingosinkinase 2 mit Claudinen in NRC-Zellen vorlag. Exemplarisch für die Claudine wurde die Ko-Lokalisation von Claudin-1 (grün) mit Sphingosinkinase 2 (rot) untersucht. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass Claudin-1 an der Zellmembran lokalisiert war (Abbildung 29a). Eine eindeutige Aussage über die zelluläre Lokalisation von Sphingosinkinase 2 konnte nicht getroffen werden, da das Fluoreszenzsignal zu schwach war und sich nicht von der Hintergrundfärbung abhob (Abbildung 29b).

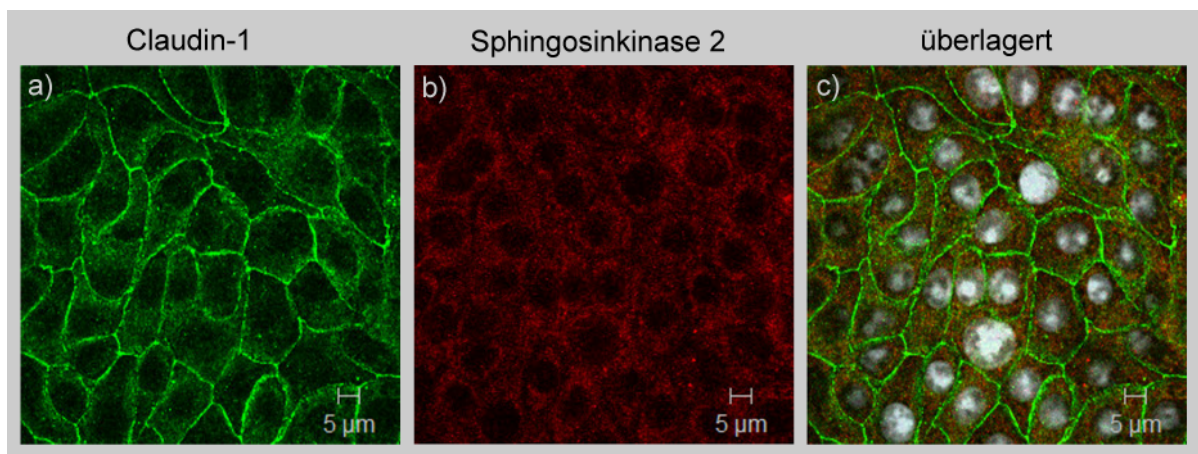


Abbildung 29: Analyse der Ko-Lokalisation von Sphingosinkinase 2 mit Claudin-1 anhand von Immunfluoreszenzfärbungen.

NRC-Zellen wurden fixiert und die Ko-Lokalisation von Claudin-1 (grün) mit Sphingosinkinase 2 (rot) analysiert.

Eine Ko-Lokalisation von Sphingosinkinase 2 mit Claudin-1 konnte daher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Mit dem Sphingosinkinase 2-Antikörper wurde außerdem eine Immunpräzipitation durchgeführt und analysiert, ob eine Ko-Immunpräzipitation von Claudinen erfolgte. Der Sphingosinkinase 2-Antikörper wurde an Protein A/G gekoppelt und mit dem NRC-Zelllysat inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem das Zelllysat nur mit dem Protein A/G inkubiert wurde. Das Präzipitat wurde anschließend anhand von Western Blots hinsichtlich einer Anreicherung von Sphingosinkinase 2 (70 kDa) und Claudin-3 (22 kDa) analysiert.

Durch die Immunpräzipitation wurde Sphingosinkinase 2 angereichert, da das Eluat der Immunpräzipitation um den Faktor 80 mehr Sphingosinkinase 2 enthielt als das Eluat der Kontrolle (Abbildung 30). Der Western Blot zeigte, dass Claudin-3 nicht spezifisch angereichert wurde, da gleiche Mengen an Claudin-3 im Eluat der Immunpräzipitation und der Kontrolle nachgewiesen wurden. Ein weiteres Claudin-3-Signal wurde bei einer Größe um die 45 kDa detektiert. Da dieses Signal ausschließlich im Durchfluss der Kontrolle sowie im Eluat der Immunpräzipitation gefunden wurde, wurden vermutlich Claudin-Dimere durch die Immunpräzipitation angereichert.

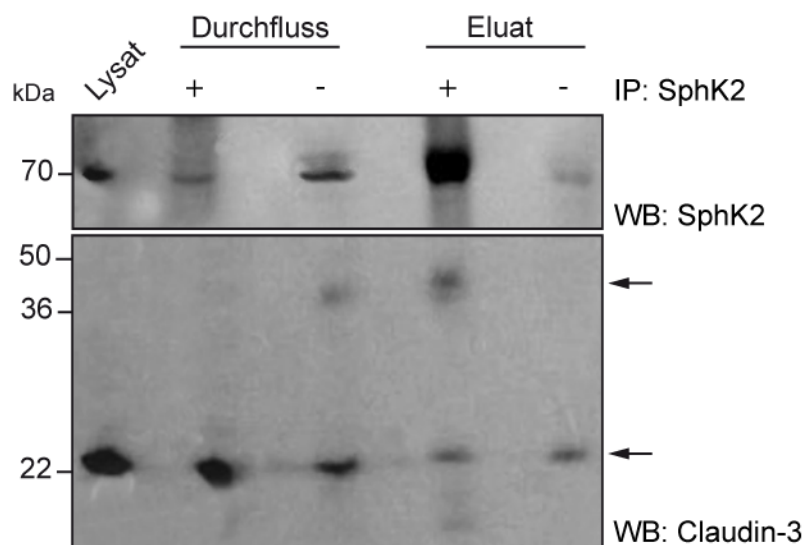


Abbildung 30: Nachweis der Anreicherung von Sphingosinkinase 2 (SphK2) und Claudin-3 durch eine Immunpräzipitation (IP) mit einem Sphingosinkinase 2-Antikörper.

Bei der Immunpräzipitation wurde der Sphingosinkinase 2-Antikörper an Protein A/G gekoppelt und mit NRC-Lysat inkubiert. Als Kontrolle wurde ausschließlich das Protein A/G mit dem Lysat inkubiert. Anhand von Western Blots (WB) wurde analysiert, ob das Präzipitat Sphingosinkinase 2 und Claudin-3 enthielt.

3.5 Proteomanalyse der durch die GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung gebundenen Proteine

Neben der Affinitätsreinigung, bei der das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsprotein als Köder für die Anreicherung von Claudinen und Claudin-assoziiierter Proteine eingesetzt wurde, wurde in einem analogen Experiment eine Affinitätsreinigung mit einem GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Fusionsprotein durchgeführt, um Interaktionspartner des transmembranalen *tight junction*-Proteins Tricellulin anzureichern. Bei dieser Affinitätsreinigung wurden Lysate der humanen Karzinomzelllinie HT29/B6 verwendet, da Tricellulin in diesen Zellen gut exprimiert wird (Abbildung 31).

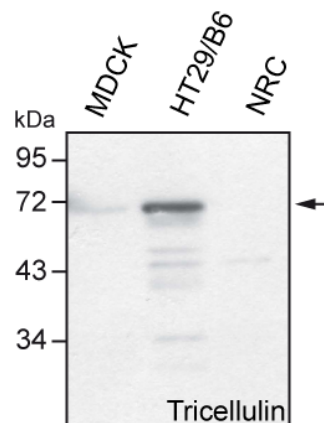


Abbildung 31: Expression von Tricellulin in MDCK-, HT29/B6- und NRC-Zellen.

Zelllysate von MDCK-, HT29/B6- und NRC-Zellen wurden durch Western Blot hinsichtlich der Expression von Tricellulin (64 kDa) analysiert.

Für die quantitative Diskriminierung unspezifisch gebundener Proteine, die an das GST-Affinitätszeptor gebunden haben, wurde die Affinitätsreinigung unter Anwendung der SILAC-Methode durchgeführt. Das GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉ wurde dabei mit dem Lysat von Zellen inkubiert, die in Gegenwart von isotope markierten [¹³C]-Aminosäuren kultiviert wurden. Die Proteine der vereinigten Eluate wurden mit einer 1D-SDS-PAGE aufgetrennt, tryptisch gespalten und die Peptide mit Tandemmassenspektrometrie analysiert.

Um die Anwendbarkeit der SILAC-Methode zu überprüfen, wurde für die eindeutig identifizierten Proteine jeder dritten Probenfraktion das ¹³C/¹²C-Verhältnis und anschließend die Verteilung aller Quantifizierungswerte bestimmt. Die Quantifizierung ergab für den Großteil der Proteine ein ¹³C/¹²C-Verhältnisse zwischen 1,0 und 1,25 (Abbildung 32). Damit wurde die zu erwartende Verteilung der Quantifizierungswerte bestätigt, und die Bestimmung des ¹³C/¹²C-Verhältnisses der gebundenen Proteine konnte zur Diskriminierung unspezifisch bindender Proteine herangezogen werden.

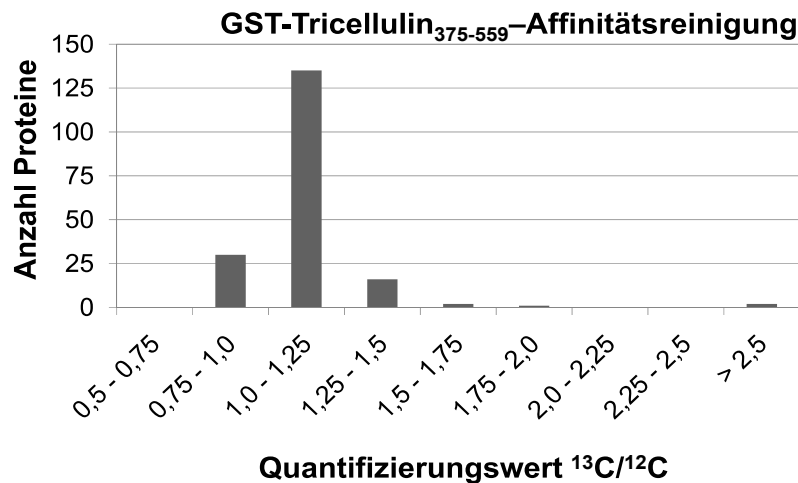


Abbildung 32: Verteilung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Quantifizierungswerte der GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung.

Von den durch die GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung gebundenen und eindeutig identifizierten Proteinen wurden die Proteine jeder dritten Probenfraktion quantifiziert.

Von den identifizierten Proteinen wurden diejenigen quantifiziert, von denen mindestens 80% der identifizierten Peptide isotopenmarkiert waren. Unter den durch die Affinitätsreinigung gebundenen Proteinen war das Protein *lysine-rich CEACAM1* (LYRIC), von dem gezeigt wurde, dass es mit ZO-1 und Occludin in Epithelzellen ko-lokalisiert (Britt et al., 04). Die physiologische Bedeutung von LYRIC in den *tight junctions* ist nicht bekannt. Für LYRIC wurde ein $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von 1,2 ermittelt, was darauf schließen ließ, dass LYRIC unspezifisch gebunden wurde.

Die Quantifizierung der durch die GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung gebundenen Proteine ergab, dass ausschließlich sechs Proteine ein $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis aufwiesen, das größer als 1,5 war (Tabelle 32). Davon ist jeweils ein Protein in den Mitochondrien (*GrpE protein homolog1*), im Endoplasmatischen Retikulum (*Collagen-binding protein 2 precursor*) und im Golgi-Apparat (*Golgi reassembly-stacking protein 2*) lokalisiert. Das *Charged multivesicular body protein 4b* (CHMP4, Shax1) ist im Zytosol lokalisiert und ist eine Komponente des *endosomal sorting complex required for transport III* (ESCRT). ESCRT-Komplexe katalysieren die Einbindung von transmembranalen Proteinen in multivesikuläre Körper, die den Transport von Membranproteinen zum Lysosom vermitteln (Babst et al., 02). Darüber hinaus wurden mit Claudin-3, -4 und -7 weitere *tight junction*-Proteine durch die GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung gebunden. Die Quantifizierung ergab, dass Claudin-7 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis = 1,4) und Claudin-3 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis = 1,3) nicht spezifisch gebunden wurden, wohingegen für Claudin-4 ein $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von 4,1 ermittelt wurde. Damit wies Claudin-4 das mit Abstand höchste $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis aller identifizierten und quantifizierten Proteine auf.

Tabelle 32: Proteine, die spezifisch durch die GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung angereichert wurden.

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Lokalisation in der Zelle	Mr [kDa]	MASCOT-score	Anzahl Peptide	Verhältnis ¹³ C/ ¹² C
Claudin-4	O19005	<i>tight junctions</i>	22014	130	2	4,1
Charged multivesicular body protein 4b	Q9H444	Zytoplasma	24935	57	1	1,9
GrpE protein homolog1	Q9HAV7	Mitochondrium	24264	91	2	1,7
Collagen-binding protein 2 precursor	P50454	Endoplasm. Retikulum	46411	46	1	1,6
Golgi reassembly-stacking protein	Q9H8Y8	Golgi-Apparat	46985	51	1	1,5

4 Diskussion

4.1 Entwicklung der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Affinitätsreinigung

4.1.1 Ko-Affinitätsreinigung durch ein GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Fusionsprotein

Für die Proteomanalyse von Claudinen und Claudin-assoziiierter Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Methode entwickelt, durch die eine spezifische Anreicherung von Claudinen gewährleistet ist. Die am häufigsten eingesetzten Verfahren für die Anreicherung von Proteinen und Protein-Komplexen im Rahmen von Proteomanalysen sind Immunpräzipitationen, Affinitätsseparationen und die TAP-Methode (Bauer und Kuster, 03). Im Hinblick auf Proteomanalysen haben Immunpräzipitationen den Nachteil, dass selbst monoklonale Antikörper Kreuzreaktivitäten zeigen. Dadurch wird eine Vielzahl von Proteinen einschließlich assoziierter Proteine angereichert, die mit dem Zielprotein in keiner Beziehung stehen und die Bestimmung tatsächlicher Interaktionspartner erschwert (Gingras et al., 05).

Für die Anreicherung von Claudinen wurde eine Affinitätsreinigung mit einem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉–Fusionsprotein gewählt. Dabei handelt es sich um eine Ko-Affinitätsreinigung, da Interaktionspartner der Claudine nicht über ein Claudin-Fusionsprotein, sondern über die Assoziation bestimmter Claudine mit dem CPE angereichert werden. Gegenüber einer Immunpräzipitation oder der TAP-Methode hat dieser Ansatz den Vorteil, dass eine simultane Anreicherung mehrerer Claudine möglich ist, da CPE mit Claudin-3, -4, -6, -7, -8 und -14 interagiert (Fujita et al., 00). Darüber hinaus weisen verschiedene Claudine Unterschiede in ihrer Sequenz auf, was die Aussicht auf eine Anreicherung verschiedener Interaktionspartner erhöht (van Itallie und Anderson, 06). Bei einer Affinitätsreinigung besteht immer eine Konkurrenz zwischen dem rekombinanten Köderprotein und dem endogenen Protein, das bereits in der Zelle Komplexe bilden kann, so dass unter Umständen nicht mehr ausreichend freie Interaktionspartner für die Assoziation mit dem Köderprotein zur Verfügung stehen (Bauer und Kuster, 03). Außerdem weist ein in *E. coli* exprimiertes Köderprotein im Allgemeinen nicht die post-translationalen Modifikationen auf, die für bestimmte Interaktionen erforderlich sind. Dies kann sich nachteilig für die Anreicherung von Interaktionspartnern auswirken, da die Affinität vieler regulatorischer Proteine für ihre Zielproteine durch post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen beeinflusst werden (Berggard et al., 07). Demgegenüber hat die Ko-Anreicherung von Claudinen über das CPE-Fusionsprotein den Vorteil, dass endogene

Claudine angereichert werden und damit die Möglichkeit besteht, mit Claudinen assoziierte Proteine anzureichern, die *in vivo* Komplexe mit den Claudinen gebildet haben. Zudem kann ein Affinitätsepitop den Ladungszustand des Köderproteins verändern, wodurch Bindungen der Interaktionspartner nicht mehr stattfinden können (Chang, 06). Dadurch, dass die Bindung an das CPE-Köderprotein über die zweite extrazelluläre Schleife der Claudine erfolgt, sind die intrazellulären N- und C-Termini der Claudine nicht durch Affinitätsepitope belegt oder beeinträchtigt.

4.1.2 Solubilisierung von Claudinen

Membranproteine verleihen der Membran in der Zelle ihre charakteristischen funktionellen Eigenschaften. Transmembranproteine wie die Claudine haben sowohl hydrophobe als auch hydrophile Regionen und sind wie die benachbarten Lipide amphipatisch. Aufgrund ihrer ambivalenten Eigenschaften können Membranproteine nur durch Detergenzien gelöst werden, die hydrophobe Verbindungen unterbrechen und die Lipid-Doppelschicht zerstören. Durch die Nutzung milder Detergenzien können viele Membranproteine in aktiver, teilweise physiologisch funktioneller Form in Lösung gebracht und gereinigt werden. Detergenzien solubilisieren Membranproteine, indem sie durch die Ausbildung von Mizellen eine der Lipid-Doppelschicht ähnliche Umgebung schaffen. Da die Lipid- und Proteinzusammensetzung nativer Membranen sehr unterschiedlich sein kann, muss für das betreffende Membranprotein ein geeignetes Detergenz individuell ermittelt werden (Seddon et al., 04).

Hinsichtlich der Solubilisierung von Claudinen wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Detergenzien miteinander verglichen. Im Vergleich zu Triton X-100 wurden in Gegenwart von CHAPS weniger Claudine solubilisiert. Aus diesem Grund und angesichts der Tatsache, dass CHAPS ein zwitterionisches Detergenz ist, dass zwar die native Struktur der Proteine eher erhält, jedoch schwache Protein-Protein-Interaktionen löst, wurde CHAPS nicht für die Solubilisierung der Claudine und Claudin-assoziierten Proteine verwendet (Seddon et al., 04). Durch den Ripa-Puffer und in Gegenwart von Triton X-100 wurden gleiche Mengen an Claudinen solubilisiert. Ripa-Puffer enthält neben dem nicht-ionischen Detergenz NP-40 die ionischen Detergenzien DOC und SDS. Ionische Detergenzien eignen sich einerseits gut für die Extrahierung von Membranproteinen, andererseits wirken sich ihre denaturierenden Eigenschaften nachteilig auf die Stabilität von Protein-Protein-Interaktionen aus (Garavito und Ferguson-Miller, 01). Um gering affine Protein-Interaktionen zu erhalten, wurde aus diesem Grund die Zellyse in Gegenwart von Triton X-100 durchgeführt. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergenz, das eher Interaktionen zwischen Lipiden sowie zwischen Lipiden und Proteinen bricht als Protein-Protein-Interaktionen. Dies erlaubt die Solubilisierung von

Membranproteinen in ihrer biologisch aktiven Form (Garavito und Ferguson-Miller, 01; Seddon et al., 04).

Ergänzend wurden bereits Interaktionen von Claudinen in Gegenwart von Triton X-100 beschrieben. Coyne et. al. zeigten heterophile Claudin-Interaktionen in Gegenwart von 0,1% Triton X-100, und Tanaka et. al. beschrieben die Bildung von Komplexen von Claudin-1 bis -4 mit Ephrin-B1 in Gegenwart von 1% Triton X-100 (Coyne et al., 03; Tanaka et al., 05a).

4.1.3 Reduzierung von unspezifischen Bindungen

Um die Komplexität der Probe zu verringern und die Identifizierung tatsächlicher Interaktionspartner zu erleichtern, mussten unspezifisch bindende Proteine im Vorfeld der massenspektrometrischen Analyse weitestgehend entfernt werden. Eine erhebliche Reduzierung der Zahl unspezifisch bindender Proteine aus dem *E. coli*-Lysat wurde erreicht, indem das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsprotein nicht durch die Inkubation des *E. coli*-Rohextraktes an das Säulenmaterial gebunden wurde, sondern durch einen zusätzlichen Schritt im Vorfeld der Affinitätsreinigung gereinigt wurde. Der zusätzliche Reinigungsschritt wirkte sich nicht auf die Stabilität und das Bindungsverhalten des CPE aus; durch beide Varianten der Affinitätsreinigung wurden gleiche Mengen an Claudin-3 angereichert. Darüber hinaus wurden einige Parameter bei der Reinigung des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsproteins verändert und dessen Reinheitsgrad dadurch weiter erhöht. Trotz stringenter Waschschrte mit 1M NaCl und 5 mM DTT blieb die Anzahl unspezifisch bindender *E. coli*-Proteine jedoch relativ hoch.

Bei der Durchführung einer Affinitätsreinigung müssen die Waschschrte mit besonderer Sorgfalt durchgeführt werden. Das Zielprotein und seine spezifisch assoziierten Proteine sollen dabei mit möglichst wenigen Kontaminationen bei Erhalt der Integrität der nativen Interaktionen angereichert werden. Es muss eine Balance zwischen der Reduzierung der unspezifisch bindenden Proteine und der Erhaltung von auch schwachen Protein-Protein-Interaktionen gefunden werden (Yang et al., 08). Aus diesem Grund wurden die Waschschrte der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung bezüglich des Detergenz unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die Zelllyse. Protein-Protein-Interaktionen, die nach der Zelllyse erhalten blieben, sollten auch stabil genug für die folgenden Waschschrte sein. Dagegen sollten die schwächeren unspezifischen Bindungen sukzessiv entfernt werden. Im Hinblick auf Lipide, die auch einen wichtigen Beitrag zur Stabilität von Protein-Protein-Interaktionen leisten können, wurde die Konzentration des Detergenz im letzten Waschschrte reduziert.

4.2 Quantitative Massenspektrometrie erlaubt die Diskriminierung unspezifisch bindender Proteine

Für die quantitative Differenzierung von Proteinen, die spezifisch an das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und unspezifisch an das GST-Affinitätsepitop der Kontrolle gebunden haben, wurde die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung mit Zelllysaten durchgeführt, die mit stabilen Isotopenmarkiert waren (SILAC-Methode). Die Isotopenmarkierung der Proteine erfolgte problemlos durch den natürlichen Umsatz der Zellen. Die Überprüfung der Markierungseffizienz zeigte, dass immer mindestens 90% der Peptide isotopenmarkiert waren. Ein Vorteil der metabolischen Markierung liegt darin, dass die Eluate von Probe und Kontrolle unmittelbar im Anschluss an die Affinitätsreinigung, d. h. vor der gelelektrophoretischen Separierung und massenspektrometrischen Analyse, kombiniert wurden. Dadurch konnte eine Reihe möglicher Fehlerquellen ab diesem Zeitpunkt vernachlässigt werden, da beide Eluate identisch behandelt wurden. Die Kombination aus Doppelmarkierung mit Arginin/Lysin und Trypsin-Verdau führte, bis auf die Carboxyl-terminalen Peptide, zu einer Markierung aller tryptischen Peptide. Hohe Standardabweichungen bei der Quantifizierung waren meistens auf Fehlsplittings oder Signalüberlagerungen zurückzuführen. Aufgrund der großen Komplexität der Probe können Peptide mit ähnlichen m/z-Werten ko-eluieren, was die korrekte Zuordnung der Signalintensitäten und den entsprechenden Peptidionen erschwert. Überlagerte Spektren und Spektren von fehlgesplittenen Peptiden wurden nicht in die Analysen einbezogen.

Ein Nachweis für die Legitimität der Nutzung der SILAC-Methode für die Diskriminierung von spezifisch und unspezifisch bindenden Proteinen, stellte die Quantifizierung der Claudine dar. Für die Claudine wurden ausnahmslos hohe Quantifizierungswerte bestimmt, die auch durch eine Affinitätsreinigung mit einer inversen Markierung reproduziert wurden, d. h. unabhängig davon, ob das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit dem isotopenmarkierten [¹³C]-Zelllysate oder mit dem unmarkierten [¹²C]-Zelllysate inkubiert wurde.

Die Verteilung der Quantifizierungswerte der Affinitätsreinigung B zeigt, dass für die unspezifisch gebundenen Proteine Quantifizierungswerte um 1,0 bestimmt wurden und dass diese den Großteil der identifizierten Proteine ausmachten. Für den Großteil der Proteine der Affinitätsreinigung C wurde ein Quantifizierungswert um 0,5 ermittelt, d. h. das Maximum der Verteilung wurde leicht verschoben. Verschobene Maxima können verschiedene Ursachen haben. Beispielsweise können bei der Affinitätsreinigung unterschiedliche Mengen an Lysaten für Probe und Kontrolle eingesetzt worden sein, da Proteinkonzentrationsbestimmungen für Zelllysate aufgrund der Divergenz der Proteine fehlerhaft sind. Des Weiteren können sich unterschiedliche Mengen an gebundenem Köderprotein und des GST-Affinitätsepitops der Kontrolle auf die Lage des Maximums der Verteilung der

Quantifizierungswerte auswirken. Solange der Großteil der Quantifizierungswerte der unspezifisch bindenden Proteine in einem relativ engen Bereich liegt und sich die Proteine mit höheren Werten deutlich von der Mehrheit dieser Werte abheben, ist eine Verschiebung des Maximums nicht problematisch. Die Quantifizierungswerte der Affinitätsreinigung A waren dagegen über einen weiten Bereich gestreut. Die breite Streuung der Werte war vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei dieser Affinitätsreinigung der *E. coli*-Rohextrakt zum Binden des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an das Säulenmaterial benutzt wurde und nicht wie bei den Affinitätsreinigungen B und C das GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ durch einen zusätzlichen Schritt gereinigt wurde.

Die Verteilungen der Quantifizierungswerte der drei Affinitätsreinigungen zeigen, dass kein allgemeingültiger Wert definiert werden kann, ab dem ein Protein als spezifisch gebunden angesehen werden kann. Aus diesem Grund sind die Werte von verschiedenen Affinitätsreinigungen auch nicht direkt vergleichbar, sondern es müssen die Tendenzen der Werte betrachtet werden.

4.3 Anreicherung von Claudinen durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung ist eine simultane Anreicherung mehrerer Claudine gelungen. Die Spezifität dieser Anreicherung wurde durch zwei unabhängige Methoden, sowohl durch Western Blot als auch durch massenspektrometrische Analysen, bestätigt. Dabei wurden nicht nur Claudine angereichert, für die bereits eine Interaktion mit CPE beschrieben wurde. Die Anreicherung von Claudin-1 und -5 zeigt, dass außerdem eine Ko-Anreicherung von Claudinen möglich ist, für die eine direkte Interaktion mit CPE ausgeschlossen wurde (Fujita et al., 00). Neben der Affinitätsreinigung mit dem NRC-Zelllysats wurde außerdem eine Affinitätsreinigung mit dem Zelllysats von Gehirnkapillarendothelzellen (hCMEC/D3) durchgeführt. Eine Western Blot Analyse zeigte, dass Claudin-3 weder im Zelllysats noch in den anderen Fraktionen der Affinitätsreinigung detektiert wurde. Weksler et al. führten eine phänotypische Charakterisierung der hCMEC/D3-Zelllinie durch und untersuchten die Expression bekannter *tight junction*-Proteine wie ZO-1, Occludin, JAM-A sowie Claudin-3 und -5 (Weksler et al., 05). Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass ZO-1, JAM-A und Claudin-5 nicht aber Occludin und Claudin-3 kontinuierlich an Zell-Zell-Kontakten exprimiert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass Claudin-3 in hCMEC/D3-Zellen nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird. Claudin-1 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl durch die Affinitätsreinigung mit epithelialen NRC-Zellen als auch mit endothelialen hCMEC/D3-Zellen spezifisch

angereichert. Dagegen erfolgte eine Anreicherung von Claudin-5 nur durch die Affinitätsreinigung in epithelialen NRC-Zellen, obwohl Claudin-5 in den hCMEC/D3-Zellen in ausreichender Menge exprimiert wird, wie die Expressionsanalyse von Weksler et al. zeigt (Weksler et al., 05). Außerdem wurde Claudin-5 im Rahmen der Western Blot Analyse eindeutig im hCMEC/D3-Zelllysate sowie in den Durchflussfraktionen von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-Kontrolle detektiert. Eine Anreicherung von Claudin-5, von dem gezeigt wurde, dass es nicht an CPE bindet, scheint nur über die Assoziation mit anderen Claudinen möglich zu sein, die in den NRC-Zellen jedoch nicht in den hCMEC/D3-Zellen exprimiert werden. Bisher wurde ausschließlich die Expression von Claudin-1, -3, und -5 in Gehirnkapillarendothelien gezeigt (Hawkins et al., 04). Heterophile Interaktionen wurden bereits für Claudin-1 und -3 sowie für Claudin-3 und -5 jedoch nicht für Claudin-1 und -5 beschrieben (Coyne et al., 03). Da Claudin-3 nicht in den hCMEC/D3-Zellen exprimiert wird und Claudin-1 und -5 nicht interagieren, wurde Claudin-5 vermutlich über Claudin-3 durch die Affinitätsreinigung mit NRC-Zellen angereichert. In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass Claudin-1 spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung mit hCMEC/D3-Zellen angereichert wurde, da Fujita et al. zeigten, dass Claudin-1 nicht an CPE bindet (Fujita et al., 00). Die spezifische Anreicherung von Claudin-1 kann einerseits über Wechselwirkungen mit einem anderen Protein erfolgen, dass spezifisch durch die Affinitätsreinigung angereichert wird. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Claudin-1 direkt an das CPE₁₁₆₋₃₁₉-Fusionsprotein gebunden hat. Für die Analyse, ob CPE mit Claudin-1 interagiert, haben sowohl Sonoda et al. als auch Fujita et al. ein kürzeres CPE-Fragment verwendet (AS 184-319) (Fujita et al., 00; Sonoda et al., 99). Für die Affinitätsreinigung dieser Arbeit wurde dagegen GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ benutzt, an das Claudin-1 binden kann, wie anhand eines *pull-down*-Experiments mit Claudin-1-transfizierten HEK-Zellen gezeigt wurde (persönliche Mitteilung, Dr. Piontek, FMP).

Die Western Blot- und massenspektrometrischen Analysen zeigen, dass, einschließlich der Daten der initialen Affinitätsreinigung mit dem Caco-2-Zelllysate, Claudin-1, -2, -3, -4, -6 und -7 durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereichert werden können. Zumindest für Claudin-2 und -5 ist von einer Anreicherung ausschließlich über die Wechselwirkung mit anderen Claudinen auszugehen, so dass die gewählten experimentellen Parameter eine Anreicherung von Claudin-Komplexen erlaubten.

4.4 Potentielle physiologische Relevanz der spezifisch angereicherten Proteine

Tight junctions stellen nicht nur eine einfache Permeabilitätsbarriere dar, sondern sind ein dynamischer Komplex. Epithelien befinden sich in einem Gleichgewicht aus Zellproliferation und Apoptose, das von einem ständigen Auf- und Abbau der *tight junctions* begleitet wird (Schock und Perrimon, 02). Dadurch, dass *tight junctions* an der Regulation vielschichtiger Prozesse wie dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Zellpolarität beteiligt sind, sind Wechselwirkungen mit den unterschiedlichsten Proteinen denkbar (Kohler und Zahraoui, 05).

Aufgrund der hohen Anzahl der durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung gebundenen Proteine wurde die Ermittlung potentieller Interaktionspartner der Claudine äußerst kritisch durchgeführt. Ein wichtiges Kriterium war, dass die Proteine reproduzierbar, d. h. durch mindestens zwei der drei Affinitätsreinigungen, gebunden wurden. Der metabolische Einbau isotoopenmarkierter Aminosäuren (SILAC) ermöglichte eine quantitative Aussage über den Grad der Spezifität, mit dem jedes Protein gebunden wurde. Eine Interaktion mit den Claudinen, ob direkt oder als Komponente eines multimeren Komplexes, konnte daraus allerdings nicht geschlussfolgert werden, da bei Affinitätsreinigungen mit einem Zelllysate auch immer Proteine angereichert werden, die für das zu analysierende Protein keinerlei physiologische Relevanz haben (Berggard et al., 07). Aus diesem Grund wurden auch Proteine, die mit einer hohen Spezifität angereichert wurden, sorgfältig betrachtet. Mögliche potentielle Interaktionspartner konnten ausschließlich durch alternative Methoden charakterisiert und verifiziert werden. Im Folgenden werden die durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Proteine im Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit den Claudinen diskutiert.

4.4.1 Kernproteine

Die Klassifizierung der reproduzierbar und spezifisch angereicherten Proteine anhand ihrer Lokalisation in der Zelle zeigt, dass die Mehrzahl der Proteine im Kern lokalisiert ist. Da *tight junctions* an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind, sind Wechselwirkungen von *tight junction*-Proteinen mit Proteinen, die im Kern lokalisiert sind unabdingbar. Informationen werden zum einen durch Signaltransduktionskaskaden von den *tight junctions* zum Kern oder über spezielle Proteine, die sich zwischen der Plasmamembran und dem Kern hin- und herbewegen, vermittelt. Letztere werden als NACos (*Nucleus and Adhesion Complexes*) bezeichnet, da sie sowohl im Zellkern als auch an Adhäsionskomplexen lokalisiert sind. Eine Lokalisation sowohl im Zellkern als auch an den

tight junctions wurde bereits für die Transkriptionsfaktoren ZONAB, huASH1 und Symplexin sowie die *cyclin-dependent kinase 4* (CDK4) beschrieben. Auch die zytosolischen *tight junction*-Proteine ZO-1 und ZO-2 sind NACos, die unter bestimmten Bedingungen im Zellkern lokalisiert sind (Balda und Matter, 03).

Unter den durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Proteinen, die im Kern lokalisiert sind, sind jedoch keine Proteine, von deren Funktionen auf einen Beitrag bei der Regulation von *tight junction*-Proteine geschlossen werden kann. RanBP2 ist am Transport von Proteinen in und aus dem Kern beteiligt, und NMES1 wirkt vermutlich als Tumorsuppressor (Wilken et al., 95; Zhou et al., 02). Etwa zwei Drittel der durch die Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Kernproteine sind in die Prozessierung bzw. den Transport von DNA/RNA involviert. Obwohl durch die Quantifizierung eine hohe Spezifität für die Anreicherung dieser Proteine ermittelt wurde, ist ein Zusammenhang mit Claudinen eher auszuschließen.

4.4.2 Proteine der Mitochondrien und Ribosomen

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurden einige mitochondriale Proteine reproduzierbar und spezifisch angereichert. Viele dieser Proteine sind in den Claudinen normalerweise nicht zugänglichen Zellkompartimenten wie der Innenmembran der Mitochondrien oder der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Es ist daher davon auszugehen, dass ihre Interaktionen mit den Claudinen erst durch den Zellaufschluss der Affinitätsreinigung möglich wurden und nicht die tatsächlichen Bedingungen in der Zelle *in vivo* widerspiegeln. In diesem Zusammenhang sind auch die Proteine der Ribosomen und Peroxisomen, die ebenfalls spezifisch angereichert wurden, zu nennen.

4.4.3 Membranproteine

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurden darüber hinaus Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, reproduzierbar und mit einer hohen Spezifität angereichert. Aufgrund ihrer Lokalisation im gleichen Zellkompartiment wie die Claudine sind Membranproteine als potentielle Interaktionspartner besonders interessant. Der LDL-Rezeptor spielt beim Cholesterinstoffwechsel eine wichtige Rolle. Der Transport von Cholesterin erfolgt im Blut als Cholesterinester in Form von Lipid-Protein-Partikeln (*low-density*-Lipoprotein, LDL). Wenn in der Zelle Cholesterin für die Membransynthese benötigt wird, werden LDL-Rezeptoren synthetisiert und in die Plasmamembran eingebaut. Nach Bindung des LDL wird der LDL-Rezeptorkomplex durch Endocytose in die Zelle aufgenommen. Anschließend verschmelzen die LDL-haltigen Vesikel mit den Lysosomen.

Während die Proteinkomponente des LDL durch Proteasen abgebaut wird, hydrolysiert eine lysosomale Lipase die Cholesterinester. Danach bewegt sich der LDL-Rezeptor zur Plasmamembran zurück (Goldstein und Brown, 85). In der Literatur sind jedoch keine Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem LDL-Rezeptor und Claudinen zu finden.

Des Weiteren wurden die α_3 - und β_1 -Untereinheit von Integrin angereichert. Integrine sind Heterodimere, deren Untereinheiten nicht kovalent miteinander verbunden sind. Die humanen Integrine setzen sich aus 24 unterschiedlichen α - und neun unterschiedlichen β -Untereinheiten zusammen. Integrine sind transmembranale Rezeptormoleküle, die einerseits für eine Verbindung der extrazellulären Matrix mit dem Zytoskelett der Zelle und andererseits für die Vermittlung von Signalen aus dem extrazellulären Raum an das Zellinnere sorgen (Lad et al., 07).

Ein Komplex an denen Claudine und Integrine beteiligt sind, wurde bereits beschrieben. OSP/Claudin-11 bildet zusammen mit OAP-1 und β_1 -Integrin einen Komplex, der an der Regulation des Wachstums und der Migration von Oligodendrocyten beteiligt ist (Tiwari-Woodruff et al., 01). OSP/Claudin-11 wird ausschließlich in der Myelinscheide der Oligodendrocyten des Zentralnervensystems sowie in den Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems exprimiert und bildet dort *tight junction*-ähnliche Strukturen (Bronstein et al., 96; Morita et al., 99b). In den polarisierten Zellen von Epithelien und Endothelien sind Integrine in der basolateralen Membran lokalisiert, während sich die *tight junctions* im apikalen Bereich der lateralen Membran befinden (Gut et al., 98). Demgegenüber wurde für Claudin-1, -3, -4 und -7 auch eine basolaterale Lokalisation in intestinalen Epithelien beschrieben (Fujita et al., 06; Holmes et al., 06; Rahner et al., 01; Tamagawa et al., 03). In epithelialen Zellen der Lunge und Niere lokalisiert Claudin-7 hauptsächlich im basolateralen Bereich der Plasmamembran (Coyne et al., 03; Li et al., 04). Die Bedeutung der basolateralen Lokalisation von Claudinen über die *tight junctions* hinaus wurde bisher nicht geklärt; vermutlich dienen sie als Reservoir. Eine weitere Erklärung wäre, dass Claudine außerdem eine Rolle bei der Regulation der Zell-Matrix-Adhäsion spielen (Chiba et al., 08). Für Claudin-7 wurde im Bereich der basolateralen Membran bereits eine direkte Assoziation mit dem Zell-Zell-Adhäsionsprotein EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) gezeigt (Ladwein et al., 05). Auch die Interaktion von Claudin-1 mit der Matrixmetalloprotease MMP2 spricht dafür, dass Claudine nicht nur wichtige Komponenten der *tight junctions* sind, sondern weitere physiologische Funktionen in anderen Bereichen der Zelle haben, die möglicherweise auch Interaktionen mit Integrinen einschließen (Miyamori et al., 01). Darüber hinaus wurde bei einer Proteomanalyse in hCMEC/D3-Zellen nach einer Ko-Immunpräzipitation mit einem Claudin-5-Antikörper Integrin- α_5 massenspektrometrisch als

potentieller Interaktionspartner von Claudin-5 identifiziert (persönliche Mitteilung, Prof. Couraud, *Institut Cochin, Centre National de la Recherche Scientifique*).

Die Daten legten eine Charakterisierung und Verifizierung der Interaktion von Claudinen mit Integrin- α_3 nahe. Die Spezifität der Anreicherung von Integrin- α_3 durch die Affinitätsreinigung wurde durch Western Blot-Analysen nicht bestätigt, da gleiche Mengen des Proteins im Eluat des GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und der GST-Kontrolle gefunden wurden. Angesichts der Tatsache, dass die in Affinitätsreinigung C nur moderate ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis = 2,6) und in Affinitätsreinigung B geringe ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis = 1,6) Anreicherung von Integrin- α_3 nicht mit einer alternativen Methode reproduziert werden konnte, ist von einer Interaktion von Claudinen mit diesem Protein nicht auszugehen.

4.4.4 Proteine des Zytoskeletts

Des Weiteren wurden durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung verschiedene Untereinheiten des Tubulins spezifisch angereichert. Tubulin ist die Proteinkomponente der Mikrotubuli, die neben den Intermediär- und den Actinfilamenten zu den drei Filamentarten des Zytoskeletts zählen. Es wird vermutet, dass das Zytoskelett bei der Regulation und Integrität der *tight junctions* eine Rolle spielt. Während bereits direkte Interaktionen zwischen *tight junctions* und dem Actinzytoskelett gezeigt wurden, gibt es lediglich Hinweise auf Wechselwirkungen von *tight junctions* mit den Mikrotubuli (Hartsock und Nelson, 08). Eine Zerstörung der Mikrotubuli führt in epithelialen Zellen der Schilddrüse zu einem Verlust der Integrität der *tight junctions* (Yap et al., 95). Ferner wurde eine Beteiligung der Mikrotubuli an der Regulation des Abbaus von *tight junctions* beschrieben. Die Internalisierung von ZO-1 und Occludin ist von einer Neuorganisation der Mikrotubuli abhängig, da sowohl die Stabilisierung als auch die Zerstörung der Mikrotubuli die Internalisierung der *tight junction*-Proteine verhindert bzw. schwächt (Ivanov et al., 06). Subramanian et al. zeigten, dass der vesikuläre Transport von Occludin vom Zellinnern zu den Zell-Zell-Kontakten in Abhängigkeit von den Mikrotubuli erfolgt, da ein Transport aufgrund fehlender Mikrotubuli nicht möglich ist (Subramanian et al., 07). Die Lokalisation von Occludin in den *tight junctions* ist dagegen nicht von der Integrität der Mikrotubuli, sondern ausschließlich von der der Actinfilamente abhängig. Die oben genannten Studien liefern erste Anhaltspunkte, dass neben den Actinfilamenten auch die Mikrotubuli an der Regulation von *tight junctions* beteiligt sind und Tubulin ein potentieller Interaktionspartner der Claudine ist. Demgegenüber steht die Tatsache, dass viele verschiedene Untereinheiten des Tubulins angereichert wurden und dass es sich bei Tubulin um ein hoch-abundantes Strukturprotein handelt, dass sehr häufig durch massenspektrometrische Analysen identifiziert wird und von daher keine physiologische Bedeutung für Claudine hat (Schirle et al., 03).

Dynein wurde ebenfalls durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereichert. Cytoplasmatische Dyneine sind Motorproteine der Mikrotubuli, die membranumhüllte Organellen zu festgelegten Stellen in der Zelle transportieren (Lacey und Haimo, 92). Folglich könnte Dynein über Tubulin spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereichert worden sein. Dagegen wurden bereits Wechselwirkungen von Dynein mit dem *adherens junction*-Protein β -Catenin beschrieben, die für eine Verbindung der Mikrotubuli mit den *adherens junction* sorgen (Ligon et al., 01). Wenn Dynein neben seiner Funktion als Motorprotein auch als Gerüstprotein der Mikrotubuli agiert, ist in dieser Hinsicht auch eine Verbindung mit Proteinen der *tight junctions* denkbar. Darüber hinaus sind bestimmte Claudine nicht ausschließlich in den *tight junctions* organisiert, sondern auch in intrazellulären Vesikeln zu finden (Rahner et al., 01). Die *tight junctions* sind ein dynamischer Komplex, da das Strangnetzwerk regelmäßig umorganisiert wird. Ein Mechanismus der dabei eine wichtige Rolle spielt, ist die Endozytose von Claudinen (Koval, 06). Für Dynein wurde bereits eine Beteiligung am Transport endocytierter Vesikel beschrieben, so dass auch in diesem Zusammenhang eine Interaktion von Claudinen und Dynein möglich wäre (Bomsel et al., 90; Goodson et al., 97).

Hinsichtlich der Endozytose von Claudinen sind auch die durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Proteine ARF4 und ARF 6, die ebenfalls in den Transport von Vesikeln involviert sind, von Interesse (Orcl et al., 93). Allerdings wurden für beide Proteine durch zwei unabhängige Affinitätsreinigungen sowohl hohe als auch Quantifizierungswerte um 1,0 ermittelt und die spezifische Anreicherung damit nicht reproduzierbar.

4.4.5 Proteine des Zytoplasmas

Neben den Plasmamembranproteinen und den Proteinen des Zytoskeletts stellen die durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Proteine, die im Zytoplasma lokalisiert sind, interessante potentielle Interaktionspartner der Claudine dar. Dazu zählt das Protein SUMO-1. SUMO-Substrate sind an der Signaltransduktion, Transkription, DNA-Reparatur und der Chromatin-Remodellierung während der Mitose beteiligt (Melchior, 00). Die Anzahl von Proteinen, die als SUMO-1-Substrate beschrieben wurden, nimmt stetig zu, so dass mittlerweile vermutet wird, dass es sich bei der Sumoylierung um eine ähnlich häufige post-translationale Modifizierung wie die Phosphorylierung handelt (Marx, 05). Zunächst wurden überwiegend nukleäre Proteine als SUMO-Substrate identifiziert, aber inzwischen wird immer häufiger beschrieben, dass auch zytoplasmatische und Proteine der Plasmamembran durch SUMO-Konjugation reguliert werden. Beispielsweise zeigten Giorgino et al., dass die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 sumoyliert werden (Giorgino

et al., 00). GLUT1 ist für den basalen Glukosetransport verantwortlich und in Abwesenheit von Insulin hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert. Dagegen wird GLUT4 vorwiegend in vesikulären Strukturen des Zytoplasmas in direkter Nähe zur Plasmamembran gefunden. Die massive Aufnahme von Glukose in Gegenwart von Insulin wird durch die Verlagerung des GLUT4 zur Plasmamembran ermöglicht. Die Regulierung dieses Glukose-Transportsystems erfolgt post-translational über Sumoylierung durch das Enzym UBC9. Für die Mitglieder der Tumornekrosefaktorrezeptor (TNFR)-Proteinfamilie TNFR-1 und Fas wurden ebenfalls Interaktionen mit SUMO-1 beschrieben, wobei diese Wechselwirkungen die Induktion der Rezeptor-vermittelten Apoptose beeinflussen (Liou und Liou, 99; Okura et al., 96).

Folglich wurde eine Vielzahl von Proteinen, die in den verschiedensten Kompartimenten der Zelle zu finden sind, bereits als SUMO-Substrate beschrieben. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass auch Claudine sumoyliert werden und durch diese Sumoylierung die Funktion oder Lokalisation von Claudinen reguliert wird. Neben SUMO-1 wurde auch das Enzym UBC9 spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereichert, das die Bindung von SUMO-1 und seinen Substraten katalysiert (Schwarz et al., 98). Folglich erschien eine weiterführende Charakterisierung und Verifizierung der Interaktion von Claudinen mit SUMO-1 sinnvoll. Die spezifische Anreicherung von SUMO-1 wurde durch die Western Blot-Analyse bestätigt. Die Western Blots zeigen allerdings auch, dass Claudine nicht als Sumoylierungssubstrate in Frage kamen, da die Claudin- und SUMO-1-Signale bei deutlich verschiedenen molekularen Massen detektiert wurden. Eine Interaktion von Claudin-4 mit einem sumoylierten Protein wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen ausgeschlossen, da SUMO-1 nicht und demzufolge auch kein sumoyliertes Protein mit Claudin-4 ko-lokalisierte.

Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei dem sumoylierten Protein um RanGAP, das bei der massenspektrometrischen Analyse zusammen mit SUMO-1 in einer Gelbande gefunden wurde und das gemäß der Quantifizierung auch spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereichert wurde. In diesem Zusammenhang sind auch RanBP2 und das Enzym UBC9 zu nennen, die ebenfalls spezifisch angereichert wurden und für die zusammen mit RanGAP und SUMO-1 eine Funktion beim Kerntransport von Proteinen beschrieben wurde. Die für den Kerntransport notwendige Energie wird durch die Hydrolyse von GTP durch die GTPase Ran zur Verfügung gestellt. Ran kommt in zwei konformativen Zuständen vor, wovon RanGDP im Zytosol und RanGTP im Zellkern lokalisiert ist. RanBP2 ist dabei zusammen mit RanGAP an der Umwandlung von RanGTP zu RanGDP beteiligt (Saitoh et al., 97). Für die Assoziation mit RanBP2 an der Kernpore ist die SUMO-1-Konjugation von RanGAP1 notwendig (Mahajan et al., 97; Matunis et al., 96), die durch UBC9 katalysiert wird (Knipscheer et al., 08; Saitoh et al., 97). Es ist daher davon

auszugehen, dass SUMO-1, RanGAP, RanBP2 und UBC9 zusammen als multimerer Komplex über die Interaktion einer Komponente durch die Affinitätsreinigung angereichert wurden, die hinsichtlich der Claudine jedoch keine physiologische Relevanz hat.

Ein weiteres Protein, das durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung reproduzierbar angereichert wurde und dessen Quantifizierung hohe Werte ergab, ist Sphingosinkinase 2. Für Sphingosinkinase 2 wurden bereits unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle beschrieben. Igarashi et al. zeigten, dass Sphingosinkinase 2 im Plasma des Zellkerns lokalisiert und dort die DNA-Synthese inhibiert, was zu einer Unterbrechung des Zellzyklus führt (Igarashi et al., 03). Aus diesem Grund wird vermutet, dass Sphingosinkinase 2 an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist. Dass Sphingosinkinase 2 die Zellproliferation unterbindet, wurde ebenfalls von Liou et al. beschrieben (Liou und Liou, 99). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Lokalisation von Sphingosinkinase 2 im Zellkern im direkten Zusammenhang mit der Apoptose von Zellen steht (Okada et al., 05). Sphingosinkinase 2 ist jedoch nicht nur im Kern lokalisiert. Es wurde ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) identifiziert, dessen Phosphorylierung durch Proteinkinase D für den Export von Sphingosinkinase 2 aus dem Kern ins Zytoplasma sorgt. Sphingosinkinase 2 akkumuliert ausschließlich unter Streßbedingungen im Zellkern, was zur Induktion der Apoptose und der Zellproliferation führt (Ding et al., 07).

Darüber hinaus zeigten Yoshimoto et al. eine Assoziation von Sphingosinkinase 2 mit dem zytoplasmatischen Teil der $\beta 1$ -Untereinheit des Interleukin-12-Rezeptors, wobei Sphingosinkinase 2 vermutlich an der Induktion von Interferon- γ durch den Rezeptor beteiligt ist (Yoshimoto et al., 03). Eine Lokalisation von Sphingosinkinase 2 an der Plasmamembran wurde auch von Hait et al. beschrieben (Hait et al., 05). Des Weiteren katalysiert Sphingosinkinase 2 die Phosphorylierung von Sphingosin, einem Metabolit der Sphingolipide, zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) (Pitson et al., 00). Sphingosin-1-Phosphat wirkt als Lipidmediator und ist an der Regulation zahlreicher Abläufe in der Zelle beteiligt. Durch die Aktivierung G-Protein-gekoppelter S1P-Rezeptoren löst Sphingosin-1-phosphat zahlreiche Signaltransduktionskaskaden aus und ist dadurch in Prozesse wie die Zellproliferation, Formierung des Zytoskeletts, Zellmigration, Immunabwehr und die Angiogenese involviert (Donati und Bruni, 06; Hait et al., 05; Lee et al., 99; Zhang et al., 91). Lee et al. zeigten, dass Sphingosin-1-Phosphat eine Rolle bei der chemotaxischen Migration von Endothelzellen spielt und an der Integrität der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist (Lee et al., 06). In diesem Zusammenhang wurde die Regulation von *tight junction*-Proteinen durch Sphingosin-1-phosphat beschrieben. Nachdem humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) elektrisch zerstört werden, führt eine Behandlung mit Sphingosin-1-Phosphat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer Relokalisation von ZO-1 und Claudin-5 an die Zell-Zell-Kontakte. Die Relokalisation

von ZO-1 und Claudin-5 wurde durch Sphingosin-1-phosphat über den S1P₁/G_i/Akt/Rac-Signalweg vermittelt. In diesem Zusammenhang ist denkbar, dass die infolge der Destruktion der *tight junctions* endozytierten Claudine bei der Aktivierung von Sphingosinkinase 2 eine Rolle spielen. Die Aktivierung führt zu der Lokalisation von Sphingosinkinase 2 an die Plasmamembran, was über die Aktivierung von Sphingosin-1-phosphat den Signalweg auslöst, der schließlich zu einer Relokalisation von *tight junction*-Proteinen an die Zell-Zell-Kontakte führt. Eine Interaktion von Claudinen mit Sphingosinkinase 2 war denkbar und wurde aus diesem Grund weiter charakterisiert.

Die spezifische Anreicherung von Sphingosinkinase 2 wurde durch die Western Blot-Analyse bestätigt. Durch eine Umkehr der Affinitätsreinigung in Form von einer Immunpräzipitation mit einem Sphingosinkinase 2-Antikörper wurde kein monomeres Claudin-3 angereichert, sondern wahrscheinlich ausschließlich Claudin-Dimere. Eine Bildung von SDS-resistenten Claudin-Dimeren wurde bereits beschrieben (Mitic et al., 03). Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen wurde außerdem eine mögliche Ko-Lokalisation von Sphingosinkinase 2 mit Claudinen überprüft. Aufgrund der mangelnden Eignung des Antikörpers für Immunfluoreszenzfärbungen war eine Aussage über die Lokalisation von Sphingosinkinase 2 in der Zelle nicht möglich. Anhand der bisher durchgeführten Verifizierungen lässt sich eine Interaktion von Sphingosinkinase 2 und Claudinen weder bestätigen noch kann sie ausgeschlossen werden. Durch die Sphingosinkinase 2-Immunpräzipitation wurden zwar vermutlich Claudin-3-Dimere angereichert, allerdings ist das Signal sehr schwach. Darüber hinaus können mit dieser Methode direkten Interaktionen nicht nachgewiesen werden. Um eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, ob und inwiefern Sphingosinkinase 2 mit Claudinen interagiert sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.5 Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung

Neben der Anreicherung von Claudinen und möglicher Claudin-assoziierten Proteine durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurde analog eine Affinitätsreinigung durchgeführt, um potentielle Interaktionspartner von Tricellulin anzureichern. Als Köder wurde ein GST-Fusionsprotein des zytosolischen C-Terminus von Tricellulin benutzt. Bei dem Experiment handelte es sich um einen Pilotversuch, und es wurde nur eine Affinitätsreinigung mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der Proteine durchgeführt. Von den fünf Proteinen, für die die Quantifizierung ein ¹³C/¹²C-Verhältnis > 1,5 ergab, sind jeweils ein Protein in den Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat lokalisiert. Diese Proteine scheinen aufgrund ihrer Lokalisation in der Zelle keine physiologische Bedeutung im Hinblick auf die Claudine zu haben. Ein weiteres Protein,

das durch die Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung spezifisch angereichert wurde, ist CHMP4, das im Zytosol lokalisiert ist und eine Rolle bei der Einbindung von Transmembranproteinen in multivesikuläre Transportkörper spielt (Babst et al., 02). Da bereits beschrieben wurde, dass bei der Regulation anderer Transmembranproteine der *tight junctions*, wie den Claudinen und Occludin, sowohl Endozytose als auch vesikulärer Transport eine Rolle spielen, ist eine Interaktion von Tricellulin mit CHMP4 denkbar (Koval, 06; Subramanian et al., 07).

Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass auch Claudin-3, -4 und -7 durch die Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung gebunden wurden. Für Claudin-4 wurde ein deutlich höherer Quantifizierungswert bestimmt als für Claudin-3 und Claudin-7, die unspezifisch gebunden wurden. Daraus lässt sich schließen, dass Tricellulin vermutlich ausschließlich mit bestimmten Claudinen in spezifische Wechselwirkungen tritt.

4.6 Proteomanalysen mit Affinitätsreinigungen

Aufgrund der hohen Sensitivität der massenspektrometrischen Methoden stellen Affinitätsreinigungen, die zur Aufklärung von Protein-Komplexen herangezogen werden, mittlerweile Hochdurchsatz-Analysen dar, bei denen sehr große Datenmengen generiert werden. Der Großteil der durch Proteomanalysen dieser Art identifizierten Proteine wird oftmals unspezifisch gebunden oder hat für den zu analysierenden Komplex keinerlei physiologische Bedeutung. Gewisse Proteine bilden einen sogenannten unspezifischen Hintergrund, der bei jeder massenspektrometrischen Analyse identifiziert wird. Hochabundante Proteine wie Proteine des Zytoskeletts oder metabolische Enzyme tragen wesentlich zu diesem unspezifischen Hintergrund bei (Schirle et al., 03). Durch die Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen können im Rahmen von Affinitätsreinigungen Proteine diskriminiert werden, die unspezifisch an das Affinitätsreagent bzw. das Säulenmaterial binden. Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass jedes Protein, für das ein hoher Quantifizierungswert bestimmt wird, eine physiologische Relevanz für den zu analysierenden Komplex hat. Eine Identifizierung wirklicher Interaktionspartner ist lediglich durch eine sorgfältige Abwägung und weiterführende experimentelle Verifizierung der Wechselwirkungen möglich (Berggard et al., 07). Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung wurden zahlreiche Proteine angereichert, durch deren Funktion oder Lokalisation in der Zelle bereits eine physiologische Bedeutung hinsichtlich der Claudine ausgeschlossen werden konnte. Die Anreicherung des Großteils dieser Proteine ist auf Wechselwirkungen mit dem CPE zurückzuführen, da im Vergleich dazu bei der GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung für deutlich weniger Proteine ein hohes ¹³C/¹²C-Verhältnis bestimmt wurde.

Darüber hinaus werden im Rahmen von Affinitätsreinigungen auch immer bereits bekannte Interaktionspartner oder bekannte Komponenten eines Komplexes nicht identifiziert. Für die Claudine wurden in der Literatur verschiedene Interaktionspartner beschrieben (1.3.2). Itoh et al. zeigten *in vitro* anhand verschiedener ZO-1-Konstrukte, dass der zytoplasmatische C-Terminus von Claudin-1 bis -8 an die PDZ1-Domäne von ZO-1 bindet (Itoh et al., 99a). Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass ZO-1 ausschließlich durch eine der drei GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigungen angereichert wurde, d. h. die Bindung war nicht reproduzierbar. Zudem zeigte die ¹³C/¹²C-Quantifizierung, dass diese Anreicherung von ZO-1 unspezifisch war. Neben der Quantifizierung der massenspektrometrischen Daten wurde die Anreicherung von ZO-1 durch Western Blots analysiert (3.2.3), die ergaben, dass ZO-1 nach der Zelllyse abgebaut wurde, da ZO-1 Signale in einem Bereich zwischen 50 und 70 kDa und nicht im erwarteten Bereich von 210-225 kDa detektiert wurden. Das lässt darauf schließen, dass durch die Proteolyse von ZO-1 Interaktionen mit Claudinen nicht mehr möglich waren.

Ferner wurden von den durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereicherten Claudinen Wechselwirkungen mit MUPP1 und PATJ sowie mit verschiedenen Connexinen und Proteinkinasen in der Literatur beschrieben (1.3.2). Die Proteine wurden nicht über die Claudine im Rahmen der Proteomanalyse dieser Arbeit angereichert und identifiziert. Des Weiteren wurden sowohl durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung als auch durch die GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung nur wenige potentielle neue Interaktionspartner identifiziert. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Zunächst ist nicht geklärt, ob die Proteine in den Zellen exprimiert wurden und ob sie während der Zelllyse mit Triton X-100 in Lösung gingen oder möglicherweise abgebaut wurden. Es sind sehr individuelle Lösungsbedingungen erforderlich, um die biologische Aktivitäten und Strukturen der verschiedenen Proteine zu erhalten. Während einige Proteine in Wasser löslich sind, benötigen andere eine hohe Ionenstärke. Da kein universelles Lösungsmittel für alle Proteine zur Verfügung steht, liefert auch die anschließende Proteomanalyse nur einen speziellen Ausschnitt an Proteinen (Rabilloud, 08). Dass ein Protein nicht durch die massenspektrometrischen Analysen identifiziert wurde, bedeutet nicht zwangsläufig, dass es nicht in der Probe vorhanden war. Beispielsweise wird die Identifizierung von Membranproteinen dadurch erschwert, dass die hydrophoben Bereiche nicht durch Trypsin gespalten werden und dadurch nicht in die Identifikation einbezogen werden (Santoni et al., 00).

Ein weiterer Grund, warum bestimmte bereits bekannte bzw. neue Interaktionspartner durch die Affinitätsreinigungen nicht angereichert wurden, ist vermutlich, dass die Interaktionen unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht hinreichend stabil waren. Demgegenüber blieben im Laufe der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung heterophile Claudin-

Interaktionen bestehen und es wurden mehrere Komponenten des Kernporenkomplexes angereichert, auch wenn dieser in keiner physiologischen Beziehung mit den Claudinen steht. Bindung ist immer ein Produkt aus Affinität und Konzentration. Durch Affinitätsreinigungen werden eher Proteine angereichert, die mit einer hohen Affinität und langsamen Dissoziationskinetik mit dem Köderprotein interagieren oder in einer hohen Konzentration vorliegen während transiente und gering-konzentrierte Bindungspartner oftmals verloren gehen. Die experimentellen Bedingungen unterscheiden sich erheblich von dem intrazellulären Milieu. In der Zelle finden Protein-Protein-Interaktionen oftmals begleitet von einer hohen, lokalen Konzentration von Proteinen statt. Durch die Zelllyse werden die Proteine jedoch verdünnt. Folglich ist die Möglichkeit, dass Protein-Wechselwirkungen im dicht konzentrierten Milieu der Zelle stattfinden höher als dass einzelne Proteine im Lysepuffer miteinander interagieren (Berggard et al., 07).

Bei der Identifizierung der Proteine spielt auch die Sensitivität der Massenspektrometrie eine entscheidende Rolle. Verschiedene Proteine liegen in der Probe in unterschiedlichen Mengen vor; der dynamische Bereich beträgt in humanen Zellen sieben bis acht Größenordnungen (Anderson und Anderson, 98). In Plasmaproben wurden Unterschiede von bis zu 12 Größenordnungen zwischen hoch- und gering-abundanten Proteinen festgestellt (Corthals et al., 00). Der Dynamikbereich der Massenspektrometrie wird bei Affinitätsreinigungen neben der zellulären Konzentration der Proteine durch deren Affinität zum Köderprotein bestimmt. Das für die Proteomanalysen dieser Arbeit eingesetzte Massenspektrometer hat einen dynamischen Bereich von 10^3 . Trotz Vorfraktionierung und Anreicherung der Proteinkomplexe durch die Affinitätsreinigungen kann es möglich sein, dass gering-abundante Proteine nicht detektiert und identifiziert wurden. Viele Proteine, die mit dem *tight junction*-Komplex assoziiert sind, sind regulatorische Proteine, die in der Regel mit einer geringen Abundanz in der Zelle vorliegen (Schirle et al., 03). Hinzu kommt, dass Signale oftmals durch transiente Interaktionen von Proteinen vermittelt werden. Da Proteomanalysen ausschließlich eine Momentaufnahme an Proteinkonstellationen liefern, können einige Interaktionen bei der Analyse verloren gehen.

4.7 Proteomanalysen von *tight junctions*

Es wurden erst wenige Arbeiten mit Proteomanalysen zur Entschlüsselung des *tight junction*-Komplexes publiziert. Eine umfassende Proteomanalyse von Proteinen, die mit *tight junctions* assoziiert sind, ist bisher ausschließlich durch die Arbeit von Brajenovic et al. gelungen (Brajenovic et al., 04). Durch eine umfassende Proteomanalyse wurde ein Interaktionsnetzwerk um die Proteine des PAR-Komplexes erstellt. Dafür wurden neun Proteine, von denen bereits bekannt war, dass sie eine Funktion bei der Regulation der

Zellpolarität haben, mit einem TAP-Affinitäsepitop versehen in HEK293-Zellen exprimiert. Die Isolierung der Interaktionspartner erfolgte über eine TAP-Affinitätsreinigung. Es wurden bekannte als auch neue Interaktionspartner der Proteine des PAR-Komplexes identifiziert. Die Komponenten dieses Komplexes waren ausnahmslos zytosolische Proteine, deren Präparation und massenspektrometrische Analyse in der Regel weniger problematisch ist. Chen et al. führten eine Affinitätsreinigung mit einem GST-ZO1_{PDZ1}-Fusionsprotein durch, um neue Interaktionspartner von ZO-1 zu finden (Chen et al., 06). Interaktionen der PDZ1 von ZO-1 wurden in der Literatur mit Claudin-1 bis -8 (Itoh et al., 99a), Claudin-16 (Ikari et al., 06), ARCVF (Kausalya et al., 04) und Connexin 36 (Giepmans, 04) beschrieben. Von diesen bekannten Interaktionspartnern wurde keiner durch die Affinitätsreinigung angereichert, jedoch wurde α -Actinin-4 als neuer Interaktionspartner der PDZ1 von ZO-1 identifiziert.

Obwohl eine weitere, von Tang entwickelte Präparation in Hinblick auf eine Anreicherung von *tight junction*-Proteinen optimiert wurde, wurden verhältnismäßig wenige bekannte *tight junction*-Proteine identifiziert (Tang, 06). Es wird erwähnt, dass unter den 912 durch Massenspektrometrie identifizierten Proteinen 20 bereits bekannte *tight junction*-Proteine sind, die jedoch nicht aufgelistet werden. Aus der kompletten Liste der identifizierten Proteine können lediglich die *tight junction*-Proteine Cingulin, Claudin-16, JAM-B und ZO-2 entnommen werden. Eine umfassende Anreicherung von *tight junction*-Proteinen ist demnach durch die Präparation nicht gelungen. Darüber hinaus ist die Bestimmung von Proteinen, die für die *tight junctions* eine physiologische Relevanz haben könnten, aus solch komplexen Listen schwierig.

Kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit entwickelten Yamazaki et al. eine Präparation, um insbesondere die integralen Membranproteine von *junctions* zu extrahieren und durch 2D-Gelelektrophorese mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung zu analysieren (Yamazaki et al., 08). Eine Auftrennung dieser Fraktion durch 2D-Gelelektrophorese erfolgte nach einer sehr stringenten Solubilisierung durch 10% NP-40 nachdem das Cholesterol der Membran durch Methyl- β -cyclodextrin und peripher assoziierte Proteine durch Extraktion mit einer 6 M Guanidin-Lösung entfernt wurden. Durch die anschließende massenspektrometrische Analyse dieser *junction*-Fraktion wurden Claudin-1, -3 und JAM-A identifiziert. Die gezielte Vorfraktionierung ermöglichte die Identifizierung von 54 Proteinen, deren physiologische Bedeutung im Hinblick auf *junctions* diskutiert werden kann.

4.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung ist erstmalig im Rahmen einer Proteomanalyse eine simultane Anreicherung und massenspektrometrische Identifizierung mehrerer Claudine gelungen. Die metabolische Markierung der Proteine mit stabilen Isotopen erlaubte die Diskriminierung von Proteinen, die unspezifisch an das GST-Affinitätseptipon gebunden haben. Proteine, für die eine verhältnismäßig hohe Spezifität der Bindung an GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ ermittelt wurde, stellten einerseits potentielle Interaktionspartner der Claudine dar. Andererseits wurde für eine Vielzahl dieser Proteine aufgrund ihrer Funktion oder Lokalisation in der Zelle eine physiologische Bedeutung für die *tight junctions* ausgeschlossen. Die geringe Anzahl an Proteinen, die trotz hoher ¹³C/¹²C-Verhältnisse physiologisch unbedeutend sind, die durch die GST-Tricellulin₃₇₅₋₅₅₉-Affinitätsreinigung angereichert wurden, ist ein Hinweis darauf, dass bei der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung eine Reihe von Proteinen mit CPE interagierten. Um solche Proteine ebenfalls durch die SILAC-Methode diskriminieren zu können, wäre eine Variante der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung sinnvoll, bei der als Kontrolle nicht das bloße GST-Affinitätseptipon sondern ein GST-CPE-Fusionsprotein eingesetzt wird, das aufgrund von Aminosäuresubstitutionen in der Claudin-Bindedomäne nicht mehr an Claudine bindet.

Von den spezifisch durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereicherten potentiellen Interaktionspartnern der Claudine wurden Integrin- α_3 , SUMO-1 und Sphingosinkinase 2 für weiterführende Charakterisierungen und Verifizierungen ausgewählt. Während für Integrin- α_3 und SUMO-1 eine Interaktion mit Claudinen ausgeschlossen wurde, konnten die durchgeführten Experimente Wechselwirkungen von Claudinen mit Sphingosinkinase 2 weder bestätigen noch widerlegen. Um dazu eine eindeutige Aussage treffen zu können, sind alternative Analysen notwendig. Weitere gängige Verfahren für die Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen sind die *yeast two-hybrid*-, FRET- und die Oberflächenplasmonresonanz-Methode (Berggard et al., 07). Aufgrund der mutmaßlichen Regulation von *tight junctions* durch die Mikrotubuli und einer möglichen Interaktion von Dynein mit Claudinen im Rahmen der Endozytose oder als Bindeglied zu den Mikrotubuli, sind von den spezifisch und reproduzierbar durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung angereicherten Proteinen außerdem Dynein und Tubulin für weiterführende Verifizierungen interessant.

Durch die in dieser Arbeit dargestellten Ansätze wurden keine Proteine gefunden, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen war, dass sie mit *tight junction*-Proteinen assoziiert sind. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Protein-Protein-Interaktionen transient sind, mit einer geringen Affinität stattfinden oder von speziellen zellulären Bedingungen abhängig sind. Um diese Interaktionen zu stabilisieren, kann im Rahmen von Affinitätsreinigungen ein *cross-linking* durchgeführt werden (Vasilescu et al.,

04). Ferner sind weitere Optimierungen der Lysebedingungen sowie eine alternative Auswahl der Detergenzien und Affinitätspepitope in Betracht zu ziehen.

Die Ergebnisse der wenigen bisher durchgeführten Proteomanalysen von *tight junctions* lassen darauf schließen, dass eine globale Proteomanalyse, die alle Proteine der *tight junctions* einbezieht aufgrund der facettenreichen Eigenschaften der beteiligten Proteine nicht möglich ist. Für eine umfassende Anreicherung der integralen Membranproteine sind einerseits sehr stringente Präparationsbedingungen erforderlich, wodurch andererseits transiente Interaktionen mit peripheren Proteinen verloren gehen. Ein komplexes Interaktions-Netzwerk der *tight junctions* kann vermutlich nur über die Kombination einzelner Ansätze, die gezielt auf die Entschlüsselung von Teilkomponenten des *tight junction*-Komplexes ausgerichtet sind, erstellt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Affinitätsreinigungen bekräftigen, dass quantitative Proteomanalysen einen wertvollen Beitrag leisten können, um aus den enormen Datenmengen verwertbare Informationen ziehen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Epithelien vielzelliger Organismen bilden eine funktionelle Grenzschicht, die für die Homöostase innerhalb und für den spezifischen Stoffaustausch zwischen den verschiedenen Kompartimenten verantwortlich ist. Der interzelluläre Spalt zwischen den Epithelzellen wird durch die *tight junctions* verschlossen, die eine selektive Permeabilitätsbarriere ausbilden und die freie Diffusion wasserlöslicher Moleküle auf dem parazellulären Weg verhindern. Viele Krankheiten sind auf eine Dysfunktion dieser Permeabilitätsbarriere zurückzuführen. Eine genaue Kenntnis der molekularen Zusammensetzung, Funktion und Regulation der *tight junctions* ist daher aus pharmakologischer Sicht von großem Interesse.

In dieser Arbeit wurden Anreicherungsstrategien entwickelt, die eine Proteomanalyse der Proteine des *tight junction*-Komplexes erlauben. Der Fokus wurde dabei auf die Claudine und auf Tricellulin gelegt, die als transmembranale Proteine das molekulare Rückgrat der *tight junctions* bilden. Die angereicherten Proteine wurden mittels 1D-Gelelektrophorese separiert und anhand von LC-Tandemmassenspektrometrie identifiziert. Durch eine Ko-Affinitätsreinigung gelang erstmals eine simultane Anreicherung verschiedener Claudine, die durch Massenspektrometrie identifiziert wurden. Darüber hinaus wurden weitere Proteine identifiziert, deren Anreicherung über eine Assoziation mit den Claudinen erfolgt sein könnte. Die metabolische Markierung der Proteine mit stabilen Isotopen (SILAC-Methode) erlaubte die quantitative Diskriminierung von Proteinen, die unspezifisch an das Matrixmaterial banden. Von den potentiellen Interaktionspartnern der Claudine wurden Integrin- α_3 , SUMO-1 und Sphingosinkinase 2 ausgewählt, um deren Interaktion mit Claudinen weiter zu verifizieren. Es wurden keine Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Claudinen und Integrin- α_3 sowie SUMO-1 gefunden, während die Interaktion von Claudinen mit Sphingosinkinase 2 weder bestätigt noch ausgeschlossen werden konnte. Ferner wurde eine Affinitätsreinigung durchgeführt, um Interaktionspartner von Tricellulin anzureichern. Durch die quantitative massenspektrometrische Analyse wurde ausschließlich Claudin-4 nicht aber Claudin-3 und -7 als potentieller, spezifischer Interaktionspartner von Tricellulin identifiziert.

Die in dieser Arbeit entwickelte Ko-Affinitätsreinigung ermöglichte erstmals eine Identifizierung mehrerer Claudine im Rahmen einer Proteomanalyse. Bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern wurden keine Proteine gefunden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Claudinen interagieren. Es wurde jedoch gezeigt, dass der methodische Ansatz einer Kombination aus Affinitätsreinigung und quantitativer Massenspektrometrie einen wertvollen Beitrag zur Entschlüsselung von Protein-Komplexen leisten kann.

6 Summary

Epithelia function as specialized barriers that separate different compartments within multicellular organisms and regulate the specific exchange of substances between them. The intercellular space between adjacent epithelial cells is sealed by tight junctions forming a permeability barrier that prevents the diffusion of molecules through the paracellular pathway. Dysregulation of the barrier occurs in a variety of diseases. Hence, a deeper knowledge is required of the molecular composition, function and regulation of tight junctions, in particular with respect to pharmacological applications.

In the present study, new enrichment strategies have been established that allow the analysis of tight junction proteins by means of a proteomic approach. Special emphasis was placed on claudins and tricellulin as these transmembrane proteins constitute the molecular backbone of the tight junctions. The purified proteins were resolved by 1D-gelelectrophoresis and identified by LC-tandem mass spectrometry. For the first time, using a co-affinity purification, the simultaneous enrichment of several claudins was accomplished that were identified by mass spectrometry. Additionally identified proteins represent potential interaction partners of the claudins, as these could be associated with claudins. The metabolic labeling of proteins with stable isotopes (SILAC-method) allowed the quantitative discrimination of proteins that bound unspecifically to the matrix. Integrin- α_3 , SUMO-1 and sphingosin kinase 2 were chosen for further verifications from the proteins considered to potentially interact with claudins. While there was no evidence for an association of claudins with integrin- α_3 and SUMO-1, an interaction of claudins with sphingosin kinase 2 could be neither confirmed nor disproved. Furthermore, an affinity purification was performed in order to enrich interaction partners of tricellulin. Claudin-4 was identified as a specific, potential interaction partner of tricellulin by quantitative mass spectrometric analysis whereas claudin-3 and -7 were determined to be enriched unspecifically.

For the first time, the established co-affinity purification allowed the simultaneous identification of several claudins by a proteomic approach. Although the determination of new interaction partners was challenging for both claudins and tricellulin, the present study demonstrates that a combination of affinity purification and quantitative mass spectrometry can substantially contribute to the elucidation of protein complexes.

7 Literatur

Anderson, N. L. und Anderson, N. G. (1998): Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words, *Electrophoresis* (Band 19), Nr. 11, Seite 1853-1861. URL: PM:9740045

Andreeva, A. Y.; Krause, E.; Muller, E. C.; Blasig, I. E. und Utepbergenov, D. I. (2001): Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 42, Seite 38480-38486. URL: PM:11502742

Babst, M.; Katzmann, D. J.; Estepa-Sabal, E. J.; Meerloo, T. und Emr, S. D. (2002): Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting, *Dev.Cell* (Band 3), Nr. 2, Seite 271-282. URL: PM:12194857

Balda, M. S.; Anderson, J. M. und Matter, K. (1996): The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain, *FEBS Lett.* (Band 399), Nr. 3, Seite 326-332. URL: PM:8985173

Balda, M. S. und Matter, K. (2000): The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression, *EMBO J.* (Band 19), Nr. 9, Seite 2024-2033. URL: PM:10790369

Balda, M. S. und Matter, K. (2003): Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression, *Trends Cell Biol.* (Band 13), Nr. 6, Seite 310-318. URL: PM:12791297

Bauer, A. und Kuster, B. (2003): Affinity purification-mass spectrometry - Powerful tools for the characterization of protein complexes, *European Journal of Biochemistry* (Band 270), Nr. 4, Seite 570-578. URL: ISI:000180844900002

Bazzoni, G. (2006): Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall, *Thrombosis and Haemostasis* (Band 95), Nr. 1, Seite 36-42. URL: ISI:000234693100007

Bazzoni, G.; Martinez-Estrada, O. M.; Orsenigo, F.; Cordenonsi, M.; Citi, S. und Dejana, E. (2000): Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 27, Seite 20520-20526. URL: PM:10877843

Berggard, T.; Linse, S. und James, P. (2007): Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions, *Proteomics*. (Band 7), Nr. 16, Seite 2833-2842. URL: PM:17640003

Blasig, I. E.; Winkler, L.; Lassowski, B.; Mueller, S. L.; Zuleger, N.; Krause, E.; Krause, G.; Gast, K.; Kolbe, M. und Piontek, J. (2006): On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins, *Cell Mol.Life Sci.* (Band 63), Nr. 4, Seite 505-514. URL: PM:16456617

Bomsel, M.; Parton, R.; Kuznetsov, S. A.; Schroer, T. A. und Gruenberg, J. (1990): Microtubule- and motor-dependent fusion in vitro between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCK cells, *Cell* (Band 62), Nr. 4, Seite 719-731. URL: PM:2143699

Brajenovic, M.; Joberty, G.; Kuster, B.; Bouwmeester, T. und Drewes, G. (2004): Comprehensive proteomic analysis of human Par protein complexes reveals an interconnected protein network, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 13, Seite 12804-12811. URL: PM:14676191

Britt, D. E.; Yang, D. F.; Yang, D. Q.; Flanagan, D.; Callanan, H.; Lim, Y. P.; Lin, S. H. und Hixson, D. C. (2004): Identification of a novel protein, LYRIC, localized to tight junctions of polarized epithelial cells, *Experimental Cell Research* (Band 300), Nr. 1, Seite 134-148. URL: ISI:000224228200013

Bronstein, J. M.; Popper, P.; Micevych, P. E. und Farber, D. B. (1996): Isolation and characterization of a novel oligodendrocyte-specific protein, *Neurology* (Band 47), Nr. 3, Seite 772-778. URL: PM:8797478

Chakrabarti, G. und McClane, B. A. (2005): The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin, *Cell Microbiol.* (Band 7), Nr. 1, Seite 129-146. URL: PM:15617529

Chang, I. F. (2006): Mass spectrometry-based proteomic analysis of the epitope-tag affinity purified protein complexes in eukaryotes, *Proteomics* (Band 6), Nr. 23, Seite 6158-6166. URL: ISI:000242879000005

Chen, V. C.; Li, X. B.; Perreault, H. und Nagy, J. I. (2006): Interaction of zonula occludens-1 (ZO-1) with alpha-actinin-4: Application of functional proteomics for identification of PDZ domain-associated proteins, *Journal of Proteome Research* (Band 5), Nr. 9, Seite 2123-2134. URL: ISI:000240200700008

Chen, Y. H.; Lu, Q.; Goodenough, D. A. und Jeansonne, B. (2002): Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells, *Mol.Biol.Cell* (Band 13), Nr. 4, Seite 1227-1237. URL: PM:11950934

Chiba, H.; Osanai, M.; Murata, M.; Kojima, T. und Sawada, N. (2008): Transmembrane proteins of tight junctions, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 588-600. URL: PM:17916321

Cohen, C. J.; Shieh, J. T.; Pickles, R. J.; Okegawa, T.; Hsieh, J. T. und Bergelson, J. M. (2001): The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 98), Nr. 26, Seite 15191-15196. URL: PM:11734628

Cordenonsi, M.; D'Atri, F.; Hammar, E.; Parry, D. A.; Kendrick-Jones, J.; Shore, D. und Citi, S. (1999a): Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin, *J.Cell Biol.* (Band 147), Nr. 7, Seite 1569-1582. URL: PM:10613913

Cordenonsi, M.; Mazzon, E.; De Rigo, L.; Baraldo, S.; Meggio, F. und Citi, S. (1997): Occludin dephosphorylation in early development of *Xenopus laevis*, *J.Cell Sci.* (Band 110 (Pt 24)), Seite 3131-3139. URL: PM:9365283

Cordenonsi, M.; Turco, F.; D'Atri, F.; Hammar, E.; Martinucci, G.; Meggio, F. und Citi, S. (1999b): *Xenopus laevis* occludin. Identification of in vitro phosphorylation sites by protein kinase CK2 and association with cingulin, *Eur.J.Biochem.* (Band 264), Nr. 2, Seite 374-384. URL: PM:10491082

Corthals, G. L.; Wasinger, V. C.; Hochstrasser, D. F. und Sanchez, J. C. (2000): The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research, *Electrophoresis* (Band 21), Nr. 6, Seite 1104-1115. URL: ISI:000086543800007

Coyne, C. B.; Gambling, T. M.; Boucher, R. C.; Carson, J. L. und Johnson, L. G. (2003): Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* (Band 285), Nr. 5, Seite L1166-L1178. URL: ISI:000185822300021

- Coyne, C. B.; Voelker, T.; Pichla, S. L. und Bergelson, J. M. (2004): The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 46, Seite 48079-48084. URL: PM:15364909
- Czeczulin, J. R.; Hanna, P. C. und McClane, B. A. (1993): Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*, *Infect.Immun.* (Band 61), Nr. 8, Seite 3429-3439. URL: PM:8335373
- D'Atri, F. und Citi, S. (2001): Cingulin interacts with F-actin in vitro, *FEBS Lett.* (Band 507), Nr. 1, Seite 21-24. URL: PM:11682052
- D'Souza, T.; Agarwal, R. und Morin, P. J. (2005): Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 28, Seite 26233-26240. URL: PM:15905176
- Daugherty, B. L.; Ward, C.; Smith, T.; Ritzenthaler, J. D. und Koval, M. (2007): Regulation of heterotypic claudin compatibility, *J.Biol.Chem.* (Band 282), Nr. 41, Seite 30005-30013. URL: PM:17699514
- de Hoog, C. L. und Mann, M. (2004): Proteomics, *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* (Band 5), Seite 267-293. URL: PM:15485350
- Denker, B. M. und Nigam, S. K. (1998): Molecular structure and assembly of the tight junction, *American Journal of Physiology-Renal Physiology* (Band 43), Nr. 1, Seite F1-F9. URL: ISI:000071504900001
- Desai, A. und Mitchison, T. J. (1997): Microtubule polymerization dynamics, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* (Band 13), Seite 83-117. URL: PM:9442869
- Ding, G.; Sonoda, H.; Yu, H.; Kajimoto, T.; Goparaju, S. K.; Jahangeer, S.; Okada, T. und Nakamura, S. (2007): Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2, *J.Biol.Chem.* (Band 282), Nr. 37, Seite 27493-27502. URL: PM:17635916
- Donati, C. und Bruni, P. (2006): Sphingosine 1-phosphate regulates cytoskeleton dynamics: implications in its biological response, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1758), Nr. 12, Seite 2037-2048. URL: PM:16890187
- Dreger, M. (2003): Subcellular proteomics, *Mass Spectrometry Reviews* (Band 22), Nr. 1, Seite 27-56. URL: ISI:000183525700002
- Ebnet, K. (2008): Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions, *Histochem.Cell Biol.* (Band 130), Nr. 1, Seite 1-20. URL: PM:18365233
- Ebnet, K.; Schulz, C. U.; Meyer Zu Brickwedde, M. K.; Pendl, G. G. und Vestweber, D. (2000): Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 36, Seite 27979-27988. URL: PM:10856295
- Ebnet, K.; Suzuki, A.; Horikoshi, Y.; Hirose, T.; Meyer Zu Brickwedde, M. K.; Ohno, S. und Vestweber, D. (2001): The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM), *EMBO J.* (Band 20), Nr. 14, Seite 3738-3748. URL: PM:11447115
- Fanning, A. S.; Mitic, L. L. und Anderson, J. M. (1999): Transmembrane proteins in the tight junction barrier, *Journal of the American Society of Nephrology* (Band 10), Nr. 6, Seite 1337-1345. URL: ISI:000080487900022

Fillmore, H. L.; VanMeter, T. E. und Broaddus, W. C. (2001): Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion, *J.Neurooncol.* (Band 53), Nr. 2, Seite 187-202. URL: PM:11716070

Fujibe, M.; Chiba, H.; Kojima, T.; Soma, T.; Wada, T.; Yamashita, T. und Sawada, N. (2004): Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions, *Exp.Cell Res.* (Band 295), Nr. 1, Seite 36-47. URL: PM:15051488

Fujita, H.; Chiba, H.; Yokozaki, H.; Sakai, N.; Sugimoto, K.; Wada, T.; Kojima, T.; Yamashita, T. und Sawada, N. (2006): Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine, *J.Histochem.Cytochem.* (Band 54), Nr. 8, Seite 933-944. URL: PM:16651389

Fujita, K.; Katahira, J.; Horiguchi, Y.; Sonoda, N.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2000): Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein, *Febs Letters* (Band 476), Nr. 3, Seite 258-261. URL: ISI:000088245000029

Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998): Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin, *Journal of Cell Biology* (Band 141), Nr. 7, Seite 1539-1550. URL: ISI:000074605300006

Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1993): Occludin - A Novel Integral Membrane-Protein Localizing at Tight Junctions, *Journal of Cell Biology* (Band 123), Nr. 6, Seite 1777-1788. URL: ISI:A1993MP48900014

Furuse, M.; Itoh, M.; Hirase, T.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1994): Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions, *J.Cell Biol.* (Band 127), Nr. 6 Pt 1, Seite 1617-1626. URL: PM:7798316

Furuse, M.; Sasaki, H. und Tsukita, S. (1999): Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands, *Journal of Cell Biology* (Band 147), Nr. 4, Seite 891-903. URL: ISI:000083817100018

Gallicano, G. I.; Kouklis, P.; Bauer, C.; Yin, M.; Vasioukhin, V.; Degenstein, L. und Fuchs, E. (1998): Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage, *J.Cell Biol.* (Band 143), Nr. 7, Seite 2009-2022. URL: PM:9864371

Gao, L.; Joberty, G. und Macara, I. G. (2002): Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6, *Curr.Biol.* (Band 12), Nr. 3, Seite 221-225. URL: PM:11839275
Garavito, R. M. und Ferguson-Miller, S. (2001): Detergents as tools in membrane biochemistry, *Journal of Biological Chemistry* (Band 276), Nr. 35, Seite 32403-32406. URL: ISI:000170746000004

Gavin, A. C.; Bosche, M.; Krause, R.; Grandi, P.; Marzioch, M.; Bauer, A.; Schultz, J.; Rick, J. M.; Michon, A. M.; Cruciat, C. M.; Remor, M.; Hofert, C.; Schelder, M.; Brajenovic, M.; Ruffner, H.; Merino, A.; Klein, K.; Hudak, M.; Dickson, D.; Rudi, T.; Gnau, V.; Bauch, A.; Bastuck, S.; Huhse, B.; Leutwein, C.; Heurtier, M. A.; Copley, R. R.; Edelmann, A.; Querfurth, E.; Rybin, V.; Drewes, G.; Raida, M.; Bouwmeester, T.; Bork, P.; Seraphin, B.; Kuster, B.; Neubauer, G. und Superti-Furga, G. (2002): Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes, *Nature* (Band 415), Nr. 6868, Seite 141-147. URL: ISI:000173159300033

- Giepmans, B. N. (2004): Gap junctions and connexin-interacting proteins, *Cardiovasc.Res.* (Band 62), Nr. 2, Seite 233-245. URL: PM:15094344
- Gilligan, D. M. und Bennett, V. (1993): The junctional complex of the membrane skeleton, *Semin.Hematol.* (Band 30), Nr. 1, Seite 74-83. URL: PM:8434261
- Gingras, A. C.; Aebersold, R. und Raught, B. (2005): Advances in protein complex analysis using mass spectrometry, *Journal of Physiology-London* (Band 563), Nr. 1, Seite 11-21. URL: ISI:000227224900002
- Gingras, A. C.; Gstaiger, M.; Raught, B. und Aebersold, R. (2007): Analysis of protein complexes using mass spectrometry, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* (Band 8), Nr. 8, Seite 645-654. URL: PM:17593931
- Giorgino, F.; de Robertis, O.; Laviola, L.; Montrone, C.; Perrini, S.; McCowen, K. C. und Smith, R. J. (2000): The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 97), Nr. 3, Seite 1125-1130. URL: PM:10655495
- Gobin, S.; Thuillier, L.; Jogl, G.; Faye, A.; Tong, L.; Chi, M.; Bonnefont, J. P.; Girard, J. und Prip-Buus, C. (2003): Functional and structural basis of carnitine palmitoyltransferase 1A deficiency, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 50, Seite 50428-50434. URL: PM:14517221
- Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1985): The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism, *J.Cell Sci.Suppl* (Band 3), Seite 131-137. URL: PM:3914990
- Gonzalez-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Nava, P. und Jaramillo, B. E. (2003): Tight junction proteins, *Progress in Biophysics & Molecular Biology* (Band 81), Nr. 1, Seite 1-44. URL: ISI:000180577300001
- Gonzalez-Mariscal, L.; Tapia, R. und Chamorro, D. (2008): Crosstalk of tight junction components with signaling pathways, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 729-756. URL: PM:17950242
- Goodson, H. V.; Valetti, C. und Kreis, T. E. (1997): Motors and membrane traffic, *Curr.Opin.Cell Biol.* (Band 9), Nr. 1, Seite 18-28. URL: PM:9013678
- Gorg, A.; Weiss, W. und Dunn, M. J. (2004): Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics, *Proteomics* (Band 4), Nr. 12, Seite 3665-3685. URL: ISI:000225801200001
- Goshe, M. B. und Smith, R. D. (2003): Stable isotope-coded proteomic mass spectrometry, *Curr.Opin.Biotechnol.* (Band 14), Nr. 1, Seite 101-109. URL: PM:12566009
- Gottardi, C. J.; Arpin, M.; Fanning, A. S. und Louvard, D. (1996): The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 93), Nr. 20, Seite 10779-10784. URL: PM:8855257
- Grindstaff, K. K.; Yeaman, C.; Anandasabapathy, N.; Hsu, S. C.; Rodriguez-Boulan, E.; Scheller, R. H. und Nelson, W. J. (1998): Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells, *Cell* (Band 93), Nr. 5, Seite 731-740. URL: PM:9630218
- Guillemot, L.; Hammar, E.; Kaister, C.; Ritz, J.; Caille, D.; Jond, L.; Bauer, C.; Meda, P. und Citi, S. (2004): Disruption of the cingulin gene does not prevent tight junction formation but

alters gene expression, *J.Cell Sci.* (Band 117), Nr. Pt 22, Seite 5245-5256. URL: PM:15454572

Guillemot, L.; Paschoud, S.; Pulimeno, P.; Foglia, A. und Citi, S. (2008): The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 601-613. URL: PM:18339298

Gut, A.; Balda, M. S. und Matter, K. (1998): The cytoplasmic domains of a beta1 integrin mediate polarization in Madin-Darby canine kidney cells by selective basolateral stabilization, *J.Biol.Chem.* (Band 273), Nr. 45, Seite 29381-29388. URL: PM:9792639

Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H. und Aebersold, R. (1999): Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat.Biotechnol.* (Band 17), Nr. 10, Seite 994-999. URL: PM:10504701

Hait, N. C.; Sarkar, S.; Le Stunff, H.; Mikami, A.; Maceyka, M.; Milstien, S. und Spiegel, S. (2005): Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 33, Seite 29462-29469. URL: PM:15951439

Hamazaki, Y.; Itoh, M.; Sasaki, H.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2002): Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule, *J.Biol.Chem.* (Band 277), Nr. 1, Seite 455-461. URL: PM:11689568

Hanna, P. C.; Mietzner, T. A.; Schoolnik, G. K. und McClane, B. A. (1991): Localization of the receptor-binding region of *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region, *J.Biol.Chem.* (Band 266), Nr. 17, Seite 11037-11043. URL: PM:1645721

Haorah, J.; Heilman, D.; Knipe, B.; Chrastil, J.; Leibhart, J.; Ghorpade, A.; Miller, D. W. und Persidsky, Y. (2005): Ethanol-induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and blood-brain barrier compromise, *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* (Band 29), Nr. 6, Seite 999-1009. URL: ISI:000230212900010

Hart, S. R. und Gaskell, S. J. (2005): LC-tandem MS in proteome characterization, *Trends in Analytical Chemistry* (Band 24), Nr. 7, Seite 566-575.

Hartsock, A. und Nelson, W. J. (2008): Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 660-669. URL: PM:17854762

Hasegawa, H.; Fujita, H.; Katoh, H.; Aoki, J.; Nakamura, K.; Ichikawa, A. und Negishi, M. (1999): Opposite regulation of transepithelial electrical resistance and paracellular permeability by Rho in Madin-Darby canine kidney cells, *J.Biol.Chem.* (Band 274), Nr. 30, Seite 20982-20988. URL: PM:10409646

Haskins, J.; Gu, L.; Wittchen, E. S.; Hibbard, J. und Stevenson, B. R. (1998): ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin, *J.Cell Biol.* (Band 141), Nr. 1, Seite 199-208. URL: PM:9531559

Hawkins, B. T.; Abbruscato, T. J.; Egleton, R. D.; Brown, R. C.; Huber, J. D.; Campos, C. R. und Davis, T. P. (2004): Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution, *Brain Res.* (Band 1027), Nr. 1-2, Seite 48-58. URL: PM:15494156

Hirabayashi, S.; Tajima, M.; Yao, I.; Nishimura, W.; Mori, H. und Hata, Y. (2003): JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1, *Mol.Cell Biol.* (Band 23), Nr. 12, Seite 4267-4282. URL: PM:12773569

Ho, Y.; Gruhler, A.; Heilbut, A.; Bader, G. D.; Moore, L.; Adams, S. L.; Millar, A.; Taylor, P.; Bennett, K.; Boutilier, K.; Yang, L. Y.; Wolting, C.; Donaldson, I.; Schandorff, S.; Shewnarane, J.; Vo, M.; Taggart, J.; Goudreau, M.; Muskat, B.; Alfano, C.; Dewar, D.; Lin, Z.; Michalickova, K.; Willems, A. R.; Sassi, H.; Nielsen, P. A.; Rasmussen, K. J.; Andersen, J. R.; Johansen, L. E.; Hansen, L. H.; Jespersen, H.; Podtelejnikov, A.; Nielsen, E.; Crawford, J.; Poulsen, V.; Sorensen, B. D.; Matthiesen, J.; Hendrickson, R. C.; Gleeson, F.; Pawson, T.; Moran, M. F.; Durocher, D.; Mann, M.; Hogue, C. W. V.; Figgeys, D. und Tyers, M. (2002): Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry, *Nature* (Band 415), Nr. 6868, Seite 180-183. URL: ISI:000173159300044

Holmes, J. L.; van Itallie, C. M.; Rasmussen, J. E. und Anderson, J. M. (2006): Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns, *Gene Expr.Patterns.* (Band 6), Nr. 6, Seite 581-588. URL: PM:16458081

Ide, N.; Hata, Y.; Nishioka, H.; Hirao, K.; Yao, I.; Deguchi, M.; Mizoguchi, A.; Nishimori, H.; Tokino, T.; Nakamura, Y. und Takai, Y. (1999): Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells, *Oncogene* (Band 18), Nr. 54, Seite 7810-7815. URL: PM:10618722

Igarashi, N.; Okada, T.; Hayashi, S.; Fujita, T.; Jahangeer, S. und Nakamura, S. (2003): Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 47, Seite 46832-46839. URL: PM:12954646

Ikari, A.; Matsumoto, S.; Harada, H.; Takagi, K.; Hayashi, H.; Suzuki, Y.; Degawa, M. und Miwa, M. (2006): Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions, *J.Cell Sci.* (Band 119), Nr. Pt 9, Seite 1781-1789. URL: PM:16608877

Ikenouchi, J.; Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (2005): Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells, *Journal of Cell Biology* (Band 171), Nr. 6, Seite 939-945. URL: ISI:000234053700006

Ishizaki, T.; Chiba, H.; Kojima, T.; Fujibe, M.; Soma, T.; Miyajima, H.; Nagasawa, K.; Wada, I. und Sawada, N. (2003): Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways, *Experimental Cell Research* (Band 290), Nr. 2, Seite 275-288. URL: ISI:000186132500010

Itoh, M.; Furuse, M.; Morita, K.; Kubota, K.; Saitou, M. und Tsukita, S. (1999a): Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins, *Journal of Cell Biology* (Band 147), Nr. 6, Seite 1351-1363. URL: ISI:000084321000020

Itoh, M.; Morita, K. und Tsukita, S. (1999b): Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin, *J.Biol.Chem.* (Band 274), Nr. 9, Seite 5981-5986. URL: PM:10026224

Itoh, M.; Sasaki, H.; Furuse, M.; Ozaki, H.; Kita, T. und Tsukita, S. (2001): Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions, *J.Cell Biol.* (Band 154), Nr. 3, Seite 491-497. URL: PM:11489913

- Ivanov, A. I.; McCall, I. C.; Babbin, B.; Samarin, S. N.; Nusrat, A. und Parkos, C. A. (2006): Microtubules regulate disassembly of epithelial apical junctions, *BMC.Cell Biol.* (Band 7), Seite 12. URL: PM:16509970
- Jeansonne, B.; Lu, Q.; Goodenough, D. A. und Chen, Y. H. (2003): Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells, *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)* (Band 49), Nr. 1, Seite 13-21. URL: PM:12839333
- Johnson, E. S. (2004): Protein modification by SUMO, *Annu.Rev.Biochem.* (Band 73), Seite 355-382. URL: PM:15189146
- Jou, T. S.; Schneeberger, E. E. und Nelson, W. J. (1998): Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases, *J.Cell Biol.* (Band 142), Nr. 1, Seite 101-115. URL: PM:9660866
- Katahira, J.; Inoue, N.; Horiguchi, Y.; Matsuda, M. und Sugimoto, N. (1997a): Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin, *J.Cell Biol.* (Band 136), Nr. 6, Seite 1239-1247. URL: PM:9087440
- Katahira, J.; Sugiyama, H.; Inoue, N.; Horiguchi, Y.; Matsuda, M. und Sugimoto, N. (1997b): *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 42, Seite 26652-26658. URL: PM:9334247
- Kausalya, P. J.; Phua, D. C. und Hunziker, W. (2004): Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF, *Mol.Biol.Cell* (Band 15), Nr. 12, Seite 5503-5515. URL: PM:15456900
- Keon, B. H.; Schafer, S.; Kuhn, C.; Grund, C. und Franke, W. W. (1996): Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein, *J.Cell Biol.* (Band 134), Nr. 4, Seite 1003-1018. URL: PM:8769423
- Klose, J. (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik.* (Band 26), Nr. 3, Seite 231-243. URL: PM:1093965
- Knipscheer, P.; Flotho, A.; Klug, H.; Olsen, J. V.; van Dijk, W. J.; Fish, A.; Johnson, E. S.; Mann, M.; Sixma, T. K. und Pichler, A. (2008): Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination, *Mol.Cell* (Band 31), Nr. 3, Seite 371-382. URL: PM:18691969
- Kohler, K. und Zahraoui, A. (2005): Tight junction: a co-ordinator of cell signalling and membrane trafficking, *Biology of the Cell* (Band 97), Nr. 8, Seite 659-665. URL: ISI:000231192500006
- Kojima, T.; Kokai, Y.; Chiba, H.; Yamamoto, M.; Mochizuki, Y. und Sawada, N. (2001): Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes, *Exp.Cell Res.* (Band 263), Nr. 2, Seite 193-201. URL: PM:11161718
- Kokai-Kun, J. F. und McClane, B. A. (1997): Determination of functional regions of *Clostridium perfringens* enterotoxin through deletion analysis, *Clin.Infect.Dis.* (Band 25 Suppl 2), Seite S165-S167. URL: PM:9310665
- Koval, M. (2006): Claudins - Key pieces in the tight junction puzzle, *Cell Communication and Adhesion* (Band 13), Nr. 3, Seite 127-138. URL: ISI:000238561200001

- Kovalenko, O. V.; Yang, X. H. und Hemler, M. E. (2007): A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9, *Mol.Cell Proteomics*. (Band 6), Nr. 11, Seite 1855-1867. URL: PM:17644758
- Lacey, M. L. und Haimo, L. T. (1992): Cytoplasmic dynein is a vesicle protein, *J.Biol.Chem.* (Band 267), Nr. 7, Seite 4793-4798. URL: PM:1531658
- Lad, Y.; Harburger, D. S. und Calderwood, D. A. (2007): Integrin cytoskeletal interactions, *Methods Enzymol.* (Band 426), Seite 69-84. URL: PM:17697880
- Ladwein, M.; Pape, U. F.; Schmidt, D. S.; Schnolzer, M.; Fiedler, S.; Langbein, L.; Franke, W. W.; Moldenhauer, G. und Zoller, M. (2005): The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7, *Experimental Cell Research* (Band 309), Nr. 2, Seite 345-357. URL: ISI:000232258400011
- Lapierre, L. A.; Tuma, P. L.; Navarre, J.; Goldenring, J. R. und Anderson, J. M. (1999): VAP-33 localizes to both an intracellular vesicle population and with occludin at the tight junction, *J.Cell Sci.* (Band 112 (Pt 21)), Seite 3723-3732. URL: PM:10523508
- Lee, J. F.; Zeng, Q.; Ozaki, H.; Wang, L.; Hand, A. R.; Hla, T.; Wang, E. und Lee, M. J. (2006): Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity, *J.Biol.Chem.* (Band 281), Nr. 39, Seite 29190-29200. URL: PM:16891661
- Lee, O. H.; Kim, Y. M.; Lee, Y. M.; Moon, E. J.; Lee, D. J.; Kim, J. H.; Kim, K. W. und Kwon, Y. G. (1999): Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (Band 264), Nr. 3, Seite 743-750. URL: PM:10544002
- Lemmers, C.; Michel, D.; Lane-Guermonprez, L.; Delgrossi, M. H.; Medina, E.; Arsanto, J. P. und Le Bivic, A. (2004): CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells, *Mol.Biol.Cell* (Band 15), Nr. 3, Seite 1324-1333. URL: PM:14718572
- Li, W. Y.; Huey, C. L. und Yu, A. S. (2004): Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 286), Nr. 6, Seite F1063-F1071. URL: PM:14722018
- Ligon, L. A.; Karki, S.; Tokito, M. und Holzbaur, E. L. (2001): Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions, *Nat.Cell Biol.* (Band 3), Nr. 10, Seite 913-917. URL: PM:11584273
- Lin, D.; Edwards, A. S.; Fawcett, J. P.; Mbamalu, G.; Scott, J. D. und Pawson, T. (2000): A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity, *Nat.Cell Biol.* (Band 2), Nr. 8, Seite 540-547. URL: PM:10934475
- Liou, M. L. und Liou, H. C. (1999): The ubiquitin-homology protein, DAP-1, associates with tumor necrosis factor receptor (p60) death domain and induces apoptosis, *J.Biol.Chem.* (Band 274), Nr. 15, Seite 10145-10153. URL: PM:10187798
- Lubman, R. L.; Zhang, X. L.; Zheng, J.; Ocampo, L.; Lopez, M. Z.; Veeraraghavan, S.; Zabski, S. M.; Danto, S. I. und Borok, Z. (2000): Integrin alpha(3)-subunit expression modulates alveolar epithelial cell monolayer formation, *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* (Band 279), Nr. 1, Seite L183-L193. URL: PM:10893217

Mahajan, R.; Delphin, C.; Guan, T.; Gerace, L. und Melchior, F. (1997): A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2, *Cell* (Band 88), Nr. 1, Seite 97-107. URL: PM:9019411

Marx, J. (2005): Cell biology. SUMO wrestles its way to prominence in the cell, *Science* (Band 307), Nr. 5711, Seite 836-839. URL: PM:15705823

Masuyama, A.; Kondoh, M.; Seguchi, H.; Takahashi, A.; Harada, M.; Fujii, M.; Mizuguchi, H.; Horiguchi, Y. und Watanabe, Y. (2005): Role of N-terminal amino acids in the absorption-enhancing effects of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Band 314), Nr. 2, Seite 789-795. URL: ISI:000230550300037

Matter, K. und Balda, M. S. (2003): Signalling to and from tight junctions, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Band 4), Nr. 3, Seite 225-236. URL: ISI:000181380200017

Matunis, M. J.; Coutavas, E. und Blobel, G. (1996): A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex, *J.Cell Biol.* (Band 135), Nr. 6 Pt 1, Seite 1457-1470. URL: PM:8978815

McClane, B. A. und Chakrabarti, G. (2004): New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin, *Anaerobe.* (Band 10), Nr. 2, Seite 107-114. URL: PM:16701507

Melchior, F. (2000): SUMO--nonclassical ubiquitin, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* (Band 16), Seite 591-626. URL: PM:11031248

Meyer, T. N.; Schwesinger, C. und Denker, B. M. (2002): Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. α (12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells, *J.Biol.Chem.* (Band 277), Nr. 28, Seite 24855-24858. URL: PM:12023272

Michel, D.; Arsanto, J. P.; Massey-Harroche, D.; Beclin, C.; Wijnholds, J. und Le Bivic, A. (2005): PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells, *J.Cell Sci.* (Band 118), Nr. Pt 17, Seite 4049-4057. URL: PM:16129888

Mitic, L. L.; Unger, Vinzenz M. und Anderson, James Melvin (2003): Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4, *Protein Science* (Band 12), Nr. 2, Seite 218-227. URL: <http://www.proteinscience.org/cgi/content/abstract/12/2/218>

Miyamori, H.; Takino, T.; Kobayashi, Y.; Tokai, H.; Itoh, Y.; Seiki, M. und Sato, H. (2001): Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 30, Seite 28204-28211. URL: PM:11382769

Morimoto, S.; Nishimura, N.; Terai, T.; Manabe, S.; Yamamoto, Y.; Shinahara, W.; Miyake, H.; Tashiro, S.; Shimada, M. und Sasaki, T. (2005): Rab13 mediates the continuous endocytic recycling of occludin to the cell surface, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 3, Seite 2220-2228. URL: PM:15528189

Morita, K.; Furuse, M.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1999a): Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands,

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Band 96), Nr. 2, Seite 511-516. URL: ISI:000078189200038

Morita, K.; Sasaki, H.; Fujimoto, K.; Furuse, M. und Tsukita, S. (1999b): Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis, *J.Cell Biol.* (Band 145), Nr. 3, Seite 579-588. URL: PM:10225958

Nagasawa, K.; Chiba, H.; Fujita, H.; Kojima, T.; Saito, T.; Endo, T. und Sawada, N. (2006): Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells, *J.Cell Physiol* (Band 208), Nr. 1, Seite 123-132. URL: PM:16547974

Nitta, T.; Hata, M.; Gotoh, S.; Seo, Y.; Sasaki, H.; Hashimoto, N.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2003): Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice, *J.Cell Biol.* (Band 161), Nr. 3, Seite 653-660. URL: PM:12743111

Nunbhakdi-Craig, V.; Machleidt, T.; Ogris, E.; Bellotto, D.; White, C. L., III und Sontag, E. (2002): Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex, *J.Cell Biol.* (Band 158), Nr. 5, Seite 967-978. URL: PM:12196510

Nusrat, A.; Brown, G. T.; Tom, J.; Drake, A.; Bui, T. T.; Quan, C. und Mrsny, R. J. (2005): Multiple protein interactions involving proposed extracellular loop domains of the tight junction protein occludin, *Mol.Biol.Cell* (Band 16), Nr. 4, Seite 1725-1734. URL: PM:15659655

O'Farrell, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J.Biol.Chem.* (Band 250), Nr. 10, Seite 4007-4021. URL: PM:236308

Okada, T.; Ding, G.; Sonoda, H.; Kajimoto, T.; Haga, Y.; Khosrowbeygi, A.; Gao, S.; Miwa, N.; Jahangeer, S. und Nakamura, S. (2005): Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 43, Seite 36318-36325. URL: PM:16103110

Okura, T.; Gong, L.; Kamitani, T.; Wada, T.; Okura, I.; Wei, C. F.; Chang, H. M. und Yeh, E. T. (1996): Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin, *J.Immunol.* (Band 157), Nr. 10, Seite 4277-4281. URL: PM:8906799

Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A. und Mann, M. (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics, *Molecular & Cellular Proteomics* (Band 1), Nr. 5, Seite 376-386. URL: ISI:000181515400004

Ong, S. E.; Kratchmarova, I. und Mann, M. (2003): Properties of C-13-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC), *Journal of Proteome Research* (Band 2), Nr. 2, Seite 173-181. URL: ISI:000182143500007

Ong, S. E. und Mann, M. (2005): Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative, *Nat.Chem.Biol.* (Band 1), Nr. 5, Seite 252-262. URL: PM:16408053

Orcl, L.; Palmer, D. J.; Amherdt, M. und Rothman, J. E. (1993): Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol, *Nature* (Band 364), Nr. 6439, Seite 732-734. URL: PM:8355790

Perkins, D. N.; Pappin, D. J. C.; Creasy, D. M. und Cottrell, J. S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* (Band 20), Nr. 18, Seite 3551-3567. URL: ISI:000085044900009

- Pitson, S. M.; D'andrea, R. J.; Vandeleur, L.; Moretti, P. A.; Xia, P.; Gamble, J. R.; Vadas, M. A. und Wattenberg, B. W. (2000): Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes, *Biochem.J.* (Band 350 Pt 2), Seite 429-441. URL: PM:10947957
- Poliak, S.; Matlis, S.; Ullmer, C.; Scherer, S. S. und Peles, E. (2002): Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells, *Journal of Cell Biology* (Band 159), Nr. 2, Seite 361-371. URL: ISI:000179051500016
- Powell, D. W. (1981): Barrier function of epithelia, *Am.J.Physiol* (Band 241), Nr. 4, Seite G275-G288. URL: PM:7032321
- Rabilloud, T. (2008): Proteomics in the pharmaceutical industry: is the analytical challenge just too large?, *European Pharmaceutical Review*, Nr. 1, Seite 19-21.
- Rahner, C.; Mitic, L. L. und Anderson, J. M. (2001): Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut, *Gastroenterology* (Band 120), Nr. 2, Seite 411-422. URL: PM:11159882
- Raschperger, E.; Engstrom, U.; Pettersson, R. F. und Fuxe, J. (2004): CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 1, Seite 796-804. URL: PM:14573622
- Riazuddin, S.; Ahmed, Z. M.; Fanning, A. S.; Lagziel, A.; Kitajiri, S.; Ramzan, K.; Khan, S. N.; Chattaraj, P.; Friedman, P. L.; Anderson, J. M.; Belyantseva, I. A.; Forge, A.; Riazuddin, S. und Friedman, T. B. (2006): Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing, *Am.J.Hum.Genet.* (Band 79), Nr. 6, Seite 1040-1051. URL: PM:17186462
- Riggs, P. K.; Angel, J. M.; Abel, E. L. und DiGiovanni, J. (2005): Differential gene expression in epidermis of mice sensitive and resistant to phorbol ester skin tumor promotion, *Mol.Carcinog.* (Band 44), Nr. 2, Seite 122-136. URL: PM:16044405
- Roh, M. H.; Makarova, O.; Liu, C. J.; Shin, K.; Lee, S.; Laurinec, S.; Goyal, M.; Wiggins, R. und Margolis, B. (2002): The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost, *J.Cell Biol.* (Band 157), Nr. 1, Seite 161-172. URL: PM:11927608
- Rojas, R.; Ruiz, W. G.; Leung, S. M.; Jou, T. S. und Apodaca, G. (2001): Cdc42-dependent modulation of tight junctions and membrane protein traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells, *Mol.Biol.Cell* (Band 12), Nr. 8, Seite 2257-2274. URL: PM:11514615
- Saha, C.; Nigam, S. K. und Denker, B. M. (1998): Involvement of Galphai2 in the maintenance and biogenesis of epithelial cell tight junctions, *J.Biol.Chem.* (Band 273), Nr. 34, Seite 21629-21633. URL: PM:9705295
- Saitoh, H.; Pu, R.; Cavenagh, M. und Dasso, M. (1997): RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 94), Nr. 8, Seite 3736-3741. URL: PM:9108047
- Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M.; Takano, H.; Noda, T. und Tsukita, S. (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Mol.Biol.Cell* (Band 11), Nr. 12, Seite 4131-4142. URL: PM:11102513
- Salter, K. D.; Roman, R. M.; LaRusso, N. R.; Fitz, J. G. und Doctor, R. B. (2000): Modified culture conditions enhance expression of differentiated phenotypic properties of normal rat cholangiocytes, *Lab Invest* (Band 80), Nr. 11, Seite 1775-1778. URL: PM:11092537

Sambrook, J.; Fritsch, E. und Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Press, NY.

Santoni, V.; Molloy, M. und Rabilloud, T. (2000): Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible?, Electrophoresis (Band 21), Nr. 6, Seite 1054-1070. URL: ISI:000086543800003

Schirle, M.; Heurtier, M. A. und Kuster, B. (2003): Profiling core proteomes of human cell lines by one-dimensional PAGE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Mol.Cell Proteomics. (Band 2), Nr. 12, Seite 1297-1305. URL: PM:14532353

Schneeberger, E. E. und Lynch, R. D. (2004): The tight junction: a multifunctional complex, American Journal of Physiology-Cell Physiology (Band 286), Nr. 6, Seite C1213-C1228. URL: ISI:000221520700001

Schnolzer, M.; Jedrzejewski, P. und Lehmann, W. D. (1996): Protease-catalyzed incorporation of ¹⁸O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, Electrophoresis (Band 17), Nr. 5, Seite 945-953. URL: PM:8783021

Schock, F. und Perrimon, N. (2002): Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis, Annu.Rev.Cell Dev.Biol. (Band 18), Seite 463-493. URL: PM:12142280

Schwarz, S. E.; Matuschewski, K.; Liakopoulos, D.; Scheffner, M. und Jentsch, S. (1998): The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (Band 95), Nr. 2, Seite 560-564. URL: PM:9435231

Seddon, A. M.; Curnow, P. und Booth, P. J. (2004): Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, Biochim.Biophys.Acta (Band 1666), Nr. 1-2, Seite 105-117. URL: PM:15519311

Shin, K.; Straight, S. und Margolis, B. (2005): PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells, J.Cell Biol. (Band 168), Nr. 5, Seite 705-711. URL: PM:15738264

Simard, A.; Di Pietro, E.; Young, C. R.; Plaza, S. und Ryan, A. K. (2006): Alterations in heart looping induced by overexpression of the tight junction protein Claudin-1 are dependent on its C-terminal cytoplasmic tail, Mech.Dev. (Band 123), Nr. 3, Seite 210-227. URL: PM:16500087

Sonoda, N.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Yonemura, S.; Katahira, J.; Horiguchi, Y. und Tsukita, S. (1999): Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier, Journal of Cell Biology (Band 147), Nr. 1, Seite 195-204. URL: ISI:000082953900018

Sonsino, J.; Gong, H.; Wu, P. und Freddo, T. F. (2002): Co-localization of junction-associated proteins of the human blood-aqueous barrier: occludin, ZO-1 and F-actin, Exp.Eye Res. (Band 74), Nr. 1, Seite 123-129. URL: PM:11878825

Sova, P.; Feng, Q.; Geiss, G.; Wood, T.; Strauss, R.; Rudolf, V.; Lieber, A. und Kiviat, N. (2006): Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis, Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. (Band 15), Nr. 1, Seite 114-123. URL: PM:16434596

Stasyk, T. und Huber, L. A. (2004): Zooming in: Fractionation strategies in proteomics, Proteomics (Band 4), Nr. 12, Seite 3704-3716. URL: ISI:000225801200003

Subramanian, V. S.; Marchant, J. S.; Ye, D.; Ma, T. Y. und Said, H. M. (2007): Tight junction targeting and intracellular trafficking of occludin in polarized epithelial cells, *Am.J.Physiol Cell Physiol* (Band 293), Nr. 5, Seite C1717-C1726. URL: PM:17855770

Suzuki, A.; Yamanaka, T.; Hirose, T.; Manabe, N.; Mizuno, K.; Shimizu, M.; Akimoto, K.; Izumi, Y.; Ohnishi, T. und Ohno, S. (2001): Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures, *J.Cell Biol.* (Band 152), Nr. 6, Seite 1183-1196. URL: PM:11257119

Takahashi, A.; Kondoh, M.; Masuyama, A.; Fujii, M.; Mizuguchi, H.; Horiguchi, Y. und Watanabe, Y. (2005): Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin in its interaction with claudin-4, *Journal of Controlled Release* (Band 108), Nr. 1, Seite 56-62. URL: ISI:000233321200006

Takuwa, Y.; Okamoto, Y.; Yoshioka, K. und Takuwa, N. (2008): Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system, *Biochim.Biophys.Acta.* URL: PM:18472021

Tamagawa, H.; Takahashi, I.; Furuse, M.; Yoshitake-Kitano, Y.; Tsukita, S.; Ito, T.; Matsuda, H. und Kiyono, H. (2003): Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region, *Lab Invest* (Band 83), Nr. 7, Seite 1045-1053. URL: PM:12861044

Tanaka, M.; Kamata, R. und Sakai, R. (2005a): EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 51, Seite 42375-42382. URL: PM:16236711

Tanaka, M.; Kamata, R. und Sakai, R. (2005b): Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation, *EMBO J.* (Band 24), Nr. 21, Seite 3700-3711. URL: PM:16211011

Tang, V. W. (2006): Proteomic and bioinformatic analysis of epithelial tight junction reveals an unexpected cluster of synaptic molecules, *Biology Direct* (Band 1). URL: ISI:000244037200001

Tao, W. A. und Aebersold, R. (2003): Advances in quantitative proteomics via stable isotope tagging and mass spectrometry, *Curr.Opin.Biotechnol.* (Band 14), Nr. 1, Seite 110-118. URL: PM:12566010

Thomas, D. R.; Philpott, G. W. und Jaffe, B. M. (1974): Prostaglandin E (PGE) control of cell proliferation in vitro: characteristics of HT-29, *J.Surg.Res.* (Band 16), Nr. 5, Seite 463-465. URL: PM:4364812

Tiwari-Woodruff, S. K.; Buznikov, A. G.; Vu, T. Q.; Micevych, P. E.; Chen, K.; Kornblum, H. I. und Bronstein, J. M. (2001): OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes, *J.Cell Biol.* (Band 153), Nr. 2, Seite 295-305. URL: PM:11309411

Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 76), Nr. 9, Seite 4350-4354. URL: PM:388439

Tsukamoto, T.; Miura, S.; Nakai, T.; Yokota, S.; Shimozawa, N.; Suzuki, Y.; Orii, T.; Fujiki, Y.; Sakai, F.; Bogaki, A.; Yasumo, H. und Osumi, T. (1995): Peroxisome assembly factor-2, a

putative ATPase cloned by functional complementation on a peroxisome-deficient mammalian cell mutant, *Nat.Genet.* (Band 11), Nr. 4, Seite 395-401. URL: PM:7493019

Umeda, K.; Ikenouchi, J.; Katahira-Tayama, S.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Nakayama, M.; Matsui, T.; Tsukita, S.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2006): ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation, *Cell* (Band 126), Nr. 4, Seite 741-754. URL: PM:16923393

van de Pavert, S. A.; Kantardzhieva, A.; Malysheva, A.; Meuleman, J.; Versteeg, I.; Levelt, C.; Klooster, J.; Geiger, S.; Seeliger, M. W.; Rashbass, P.; Le Bivic, A. und Wijnholds, J. (2004): Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure, *J.Cell Sci.* (Band 117), Nr. Pt 18, Seite 4169-4177. URL: PM:15316081

van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (2006): Claudins and epithelial paracellular transport, *Annual Review of Physiology* (Band 68), Seite 403-429. URL: ISI:000237272000016

van Itallie, C. M.; Betts, L.; Smedley, J. G., III; McClane, B. A. und Anderson, J. M. (2008): Structure of the claudin-binding domain of *Clostridium perfringens* enterotoxin, *J.Biol.Chem.* (Band 283), Nr. 1, Seite 268-274. URL: PM:17977833

Vasilescu, J.; Guo, X. C. und Kast, J. (2004): Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry, *Proteomics* (Band 4), Nr. 12, Seite 3845-3854. URL: ISI:000225801200015

Vincent, M. L.; Russell, R. M. und Sasak, V. (1985): Folic acid uptake characteristics of a human colon carcinoma cell line, Caco-2. A newly-described cellular model for small intestinal epithelium, *Hum.Nutr.Clin.Nutr.* (Band 39), Nr. 5, Seite 355-360. URL: PM:4055425

von Herbay, A. und Rudi, J. (2000): Role of apoptosis in gastric epithelial turnover, *Microsc.Res.Tech.* (Band 48), Nr. 5, Seite 303-311. URL: PM:10700047

Vroman, B. und LaRusso, N. F. (1996): Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells, *Lab Invest* (Band 74), Nr. 1, Seite 303-313. URL: PM:8569194

Walsh, S. V.; Hopkins, A. M.; Chen, J.; Narumiya, S.; Parkos, C. A. und Nusrat, A. (2001): Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia, *Gastroenterology* (Band 121), Nr. 3, Seite 566-579. URL: PM:11522741

Wang, Y.; Du, D.; Fang, L.; Yang, G.; Zhang, C.; Zeng, R.; Ullrich, A.; Lottspeich, F. und Chen, Z. (2006): Tyrosine phosphorylated Par3 regulates epithelial tight junction assembly promoted by EGFR signaling, *EMBO J.* (Band 25), Nr. 21, Seite 5058-5070. URL: PM:17053785

Weber, E.; Berta, G.; Tousson, A.; St John, P.; Green, M. W.; Gopalokrishnan, U.; Jilling, T.; Sorscher, E. J.; Elton, T. S.; Abrahamson, D. R. und . (1994): Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells, *J.Cell Biol.* (Band 125), Nr. 3, Seite 583-594. URL: PM:8175882

Wegmann, F.; Ebnet, K.; Du, Pasquier L.; Vestweber, D. und Butz, S. (2004): Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts, *Exp.Cell Res.* (Band 300), Nr. 1, Seite 121-133. URL: PM:15383320

Weksler, B. B.; Subileau, E. A.; Perriere, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M.; Tricoire-Leignel, H.; Nicotra, A.; Bourdoulous, S.; Turowski, P.; Male, D. K.; Roux, F.; Greenwood, J.; Romero, I. A. und Couraud, P. O. (2005): Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line, *The FASEB Journal*, Seite 04-3458fje. URL: <http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/04-3458fjev1>

Wells, C. D.; Fawcett, J. P.; Traweger, A.; Yamanaka, Y.; Goudreault, M.; Elder, K.; Kulkarni, S.; Gish, G.; Virag, C.; Lim, C.; Colwill, K.; Starostine, A.; Metalnikov, P. und Pawson, T. (2006): A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells, *Cell* (Band 125), Nr. 3, Seite 535-548. URL: PM:16678097

Wheeler, C. H.; Berry, S. L.; Wilkins, M. R.; Corbett, J. M.; Ou, K.; Gooley, A. A.; Humphery-Smith, I.; Williams, K. L. und Dunn, M. J. (1996): Characterisation of proteins from two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry and amino acid compositional analysis, *Electrophoresis* (Band 17), Nr. 3, Seite 580-587. URL: PM:8740183

Wilken, N.; Senecal, J. L.; Scheer, U. und Dabauvalle, M. C. (1995): Localization of the Ran-GTP binding protein RanBP2 at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex, *Eur.J.Cell Biol.* (Band 68), Nr. 3, Seite 211-219. URL: PM:8603673

Wilkins, M. R.; Sanchez, J. C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F. und Williams, K. L. (1996): Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnol.Genet.Eng Rev.* (Band 13), Seite 19-50. URL: PM:8948108

Wittchen, E. S.; Haskins, J. und Stevenson, B. R. (1999): Protein interactions at the tight junction - Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3, *Journal of Biological Chemistry* (Band 274), Nr. 49, Seite 35179-35185. URL: ISI:000083979600095

Wolburg, H. und Lippoldt, A. (2002): Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation, *Vascular Pharmacology* (Band 38), Nr. 6, Seite 323-337. URL: ISI:000178580200004

Wolburg, H.; Wolburg-Buchholz, K.; Kraus, J.; Rascher-Eggstein, G.; Liebner, S.; Hamm, S.; Duffner, F.; Grote, E. H.; Risau, W. und Engelhardt, B. (2003): Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme, *Acta Neuropathol.* (Band 105), Nr. 6, Seite 586-592. URL: PM:12734665

Wolters, D. A.; Washburn, M. P. und Yates, J. R., III (2001): An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics, *Anal.Chem.* (Band 73), Nr. 23, Seite 5683-5690. URL: PM:11774908

Yamamoto, T.; Harada, N.; Kano, K.; Taya, S.; Canaani, E.; Matsuura, Y.; Mizoguchi, A.; Ide, C. und Kaibuchi, K. (1997): The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells, *J.Cell Biol.* (Band 139), Nr. 3, Seite 785-795. URL: PM:9348294

Yamanaka, T.; Horikoshi, Y.; Suzuki, A.; Sugiyama, Y.; Kitamura, K.; Maniwa, R.; Nagai, Y.; Yamashita, A.; Hirose, T.; Ishikawa, H. und Ohno, S. (2001): PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex, *Genes Cells* (Band 6), Nr. 8, Seite 721-731. URL: PM:11532031

- Yamauchi, K.; Rai, T.; Kobayashi, K.; Sohara, E.; Suzuki, T.; Itoh, T.; Suda, S.; Hayama, A.; Sasaki, S. und Uchida, S. (2004): Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 101), Nr. 13, Seite 4690-4694. URL: PM:15070779
- Yamazaki, Y.; Okawa, K.; Yano, T.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (2008): Optimized proteomic analysis on gels of cell-cell adhering junctional membrane proteins, *Biochemistry* (Band 47), Nr. 19, Seite 5378-5386. URL: PM:18416558
- Yang, W.; Steen, H. und Freeman, M. R. (2008): Proteomic approaches to the analysis of multiprotein signaling complexes, *Proteomics*. (Band 8), Nr. 4, Seite 832-851. URL: PM:18297654
- Yap, A. S.; Stevenson, B. R.; Abel, K. C.; Cragoe, E. J., Jr. und Manley, S. W. (1995): Microtubule integrity is necessary for the epithelial barrier function of cultured thyroid cell monolayers, *Exp.Cell Res.* (Band 218), Nr. 2, Seite 540-550. URL: PM:7796888
- Yates, J. R., III; Eng, J. K.; McCormack, A. L. und Schieltz, D. (1995): Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database, *Anal.Chem.* (Band 67), Nr. 8, Seite 1426-1436. URL: PM:7741214
- Yates, J. R., III; McCormack, A. L.; Schieltz, D.; Carmack, E. und Link, A. (1997): Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry, *J.Protein Chem.* (Band 16), Nr. 5, Seite 495-497. URL: PM:9246634
- Yoshimoto, T.; Furuhashi, M.; Kamiya, S.; Hisada, M.; Miyaji, H.; Magami, Y.; Yamamoto, K.; Fujiwara, H. und Mizuguchi, J. (2003): Positive modulation of IL-12 signaling by sphingosine kinase 2 associating with the IL-12 receptor beta 1 cytoplasmic region, *J.Immunol.* (Band 171), Nr. 3, Seite 1352-1359. URL: PM:12874225
- Zahraoui, A.; Joberty, G.; Arpin, M.; Fontaine, J. J.; Hellio, R.; Tavitian, A. und Louvard, D. (1994): A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells, *J.Cell Biol.* (Band 124), Nr. 1-2, Seite 101-115. URL: PM:8294494
- Zhang, H.; Desai, N. N.; Olivera, A.; Seki, T.; Brooker, G. und Spiegel, S. (1991): Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation, *J.Cell Biol.* (Band 114), Nr. 1, Seite 155-167. URL: PM:2050740
- Zhou, J.; Wang, H.; Lu, A.; Hu, G.; Luo, A.; Ding, F.; Zhang, J.; Wang, X.; Wu, M. und Liu, Z. (2002): A novel gene, NMES1, downregulated in human esophageal squamous cell carcinoma, *Int.J.Cancer* (Band 101), Nr. 4, Seite 311-316. URL: PM:12209954
- Ziegler, W. H.; Gingras, A. R.; Critchley, D. R. und Emsley, J. (2008): Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin, *Biochem.Soc.Trans.* (Band 36), Nr. Pt 2, Seite 235-239. URL: PM:18363566

8 Anhang

8.1 Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung A gebundene Proteine

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	(P0A6G1)	369	8
130 kDa leucine-rich protein (LRP 130) (GP130)	(P42704)	71	2
14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	(P62261)	385	7
14-3-3 protein gamma-A	(Q6PCG0)	325	4
26S protease regulatory subunit 4 (P26s4) ((Q90732)	89	2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	(Q99460)	457	8
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	(O00232)	91	1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	(Q9LT08)	54	1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	(Q8VDM4)	218	3
30S ribosomal protein S12	(Q92QH4)	104	2
30S ribosomal protein S2	(P0A7V2)	257	7
30S ribosomal protein S3	(P47403)	489	9
39S ribosomal protein L12	(P52827)	83	2
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	(P29266)	104	2
40S ribosomal protein S10	(P63325)	314	6
40S ribosomal protein S15a	(P62244)	416	10
40S ribosomal protein S16	(P62249)	379	8
40S ribosomal protein S17	(P63273)	201	4
40S ribosomal protein S18	(Q3T0R1)	474	9
40S ribosomal protein S19	(P39019)	237	5
40S ribosomal protein S20	(P60866)	139	3
40S ribosomal protein S23	(P62298)	136	3
40S ribosomal protein S24	(Q56JU9)	137	2
40S ribosomal protein S25	(Q56JX5)	172	4
40S ribosomal protein S26	(P30742)	173	3
40S ribosomal protein S27-like protein	(Q3T0B7)	82	1
40S ribosomal protein S28	(Q6PBK3)	209	4
40S ribosomal protein S29	(P62276)	50	2
40S ribosomal protein S3a (EtS3a)	(O43999)	469	10
40S ribosomal protein S4, X isoform	(Q76N24)	109	2
40S ribosomal protein S5b	(Q9VFE4)	154	3
40S ribosomal protein S9-A	(Q09757)	51	1
40S ribosomal protein SA (p40) (C10 protein)	(P26452)	126	2
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	(Q9JLJ3)	135	3
50S ribosomal protein L18	(Q89JA0)	93	1
50S ribosomal protein L7/L12 (L8)	(P0A7K4)	404	8
60S acidic ribosomal protein P0 (L10E) (Fragment)	(Q95140)	405	6
60S acidic ribosomal protein P1	(P18660)	117	2
60S acidic ribosomal protein P2	(P02401)	199	3
60S ribosomal protein L12	(P23358)	326	5
60S ribosomal protein L18a	(P62717)	79	2
60S ribosomal protein L23 (Ribosomal protein L17)	(P62829)	397	7
60S ribosomal protein L23a	(P62750)	188	3
60S ribosomal protein L26	(P61257)	410	8
60S ribosomal protein L27	(P61356)	129	3
60S ribosomal protein L27a	(P18445)	117	3
60S ribosomal protein L30	(P58372)	124	3

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
60S ribosomal protein L31	(P62899)	295	6
60S ribosomal protein L34	(Q7ZWJ7)	148	3
60S ribosomal protein L35	(Q3MHM7)	62	1
60S ribosomal protein L35a	(P18077)	178	6
60S ribosomal protein L36	(Q3T171)	150	4
60S ribosomal protein L38	(P63173)	154	4
60S ribosomal protein L40 (CEP52)	(P63048)	47	1
60S ribosomal protein L7a	(P32429)	140	3
60S ribosomal protein L8	(P62917)	225	5
78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor	(P36604)	951	13
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32	(O35381)	61	1
Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	(Q99KI0)	219	5
Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	(P62739)	300	5
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	(P60712)	812	16
Actin-binding protein chain A (ABP-A) (Fragment)	(P25229)	76	1
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	(O15144)	298	6
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	(O15145)	249	4
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	(P59998)	246	5
Acyl carrier protein, mitochondrial precursor	(P52505)	122	3
Acyl-CoA dehydrogenase family member 9	(Q8JZN5)	87	2
Acyl-CoA-binding protein (ACBP)	(P11030)	258	6
Adenine phosphoribosyltransferase	(Q64414)	127	3
Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1)	(P40124)	134	4
ADP/ATP translocase 1	(P48962)	89	2
ADP/ATP translocase 2	(P05141)	666	13
ADP-ribosylation factor 3	(P40994)	317	3
ADP-ribosylation factor 4	(P61750)	322	6
ADP-ribosylation factor 5	(P84085)	274	1
ADP-ribosylation factor-like protein 1	(P40616)	53	1
ADP-ribosylation factor-like protein 8B	(Q2KI07)	59	2
ADP-sugar pyrophosphatase	(Q6AY63)	59	1
Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BGQ7)	92	2
Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	(P49419)	77	1
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	(P81178)	943	18
Aldose reductase	(P16116)	141	1
Aldose reductase-related protein 1	(P21300)	156	4
Alpha-actinin-1	(Q9Z1P2)	633	2
Alpha-actinin-4 (Non-muscle alpha-actinin 4)	(P57780)	1328	26
Alpha-enolase	(P04764)	419	9
Alpha-S1-casein precursor	(P02662)	151	3
Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein	(Q810B6)	56	1
Annexin A1 (Annexin I) (Lipocortin I)	(P10107)	244	3
Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II)	(Q07936)	284	5
Annexin A3 (Annexin III) (Lipocortin III)	(P14669)	800	13
Annexin A4 (Annexin IV) (Lipocortin IV)	(P55260)	56	1
Annexin A5 (Annexin V) (Lipocortin V)	(P14668)	877	14
Annexin A8 (Annexin VIII)	(O35640)	598	10
AP-2 complex subunit alpha-1	(P17426)	74	2
AP-2 complex subunit beta-1	(P63010)	66	1
Apolipoprotein A-I precursor	(O42363)	47	1
Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(P37880)	79	1
Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	(Q5ZJU3)	47	1
Aspartate aminotransferase	(P05202)	181	2
Aspartyl aminopeptidase	(Q9Z2W0)	227	5
Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q3SYZ4)	60	2
ATP synthase beta chain	(P0ABB4)	765	13
ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor	(P05630)	54	1
ATP synthase e chain, mitochondrial	(P29419)	171	3

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
ATP synthase epsilon chain, mitochondrial	(P05632)	61	2
ATP synthase gamma chain, mitochondrial	(P35435)	307	5
ATP synthase O subunit, mitochondrial precursor	(Q06647)	436	7
ATP synthase protein 8	(P11608)	58	2
ATP synthase subunit alpha	(Q89X72)	1280	21
ATPase family AAA domain-containing protein 3	(Q92511)	176	3
ATPase family AAA domain-containing protein 3A	(Q9NVI7)	147	1
ATPase inhibitor, mitochondrial precursor	(Q9UII2)	53	1
ATP-binding cassette sub-family E member 1	(P61221)	206	4
ATP-binding cassette sub-family F member 1	(Q6P542)	50	1
ATP-dependent RNA helicase DDX39	(O00148)	77	1
Beta-casein precursor	(P02666)	68	2
Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase :	(Q8CGC7)	283	5
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	(P31335)	57	1
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	(Q922D8)	86	2
CAD protein [Includes: Glutamine-dependent carbamo	(Q91437)	396	8
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aral	(O75746)	54	1
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aral	(Q9QXX4)	397	8
Calmodulin-alpha (CaM A) (Fragment)	(P62146)	93	2
Calpain-1 catalytic subunit	(P07384)	58	1
Calpain-2 catalytic subunit precursor	(Q9GLG1)	56	1
Carbonyl reductase [NADPH] 1	(P47727)	300	6
Carnitine O-palmitoyltransferase I, liver isoform	(P97742)	50	2
Cathepsin D precursor	(P24268)	87	2
CD59 glycoprotein precursor	(P27274)	72	1
CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransfe	(O14735)	48	1
Cell division control protein 42 homolog	(Q90694)	181	3
Chloride intracellular channel protein 1	(O00299)	60	2
Clathrin heavy chain	(Q68FD5)	1771	33
Claudin-3	(Q9Z0G9)	239	5
Claudin-4	(Q6BBL6)	64	1
Coactosin-like protein	(Q14019)	92	2
Coatomer subunit alpha (Alpha-coat protein)	(Q27954)	671	14
Coatomer subunit beta' (Beta'-coat protein)	(P35605)	136	3
Coatomer subunit beta (Beta-coat protein)	(P53618)	127	3
Coatomer subunit delta (Delta-coat protein)	(P53619)	99	2
Coatomer subunit epsilon (Epsilon-coat protein)	(O89079)	58	1
Coatomer subunit gamma (Gamma-coat protein)	(P53620)	61	1
Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform)	(P18760)	403	8
Complement component 1 Q subcomponent-binding prot	(O35658)	95	1
Coronin-1B (Coronin-2)	(Q9BR76)	73	2
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	(Q86VP6)	294	4
Cystatin B (Liver thiol proteinase inhibitor)	(P01041)	64	1
Cysteine-rich protein 1	(P63254)	159	3
Cytochrome b5 (Fragment)	(P00168)	52	1
Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog	(Q8BJ03)	92	2
Cytochrome c oxidase polypeptide Vb	(P00428)	61	2
Cytochrome c oxidase polypeptide VIIa-liver/heart	(P35171)	66	1
Cytochrome c, somatic	(P62897)	366	7
Cytosolic nonspecific dipeptidase	(Q9D1A2)	144	2
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	(P29147)	126	3
Defender against cell death 1 (DAD-1)	(P61803)	70	1
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	(Q8CHT0)	191	3
Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase	(Q62651)	62	1
Delta-aminolevulinic acid dehydratase	(P13716)	71	1
Destrin (Actin-depolymerizing factor) (ADF)	(Q9R0P5)	367	6
Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2)	(O02675)	92	2
Dipeptidyl-peptidase 3 (EC 3.4.14.4)	(Q9NY33)	74	2

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
DNA damage-binding protein 1	(P33194)	403	11
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	(P78527)	47	2
DNA-directed RNA polymerase II 14.5 kDa polypeptid	(P36954)	85	1
DNA-directed RNA polymerase II 19 kDa polypeptide	(Q5E9B8)	49	1
DNA-directed RNA polymerase II 33 kDa polypeptide	(P97760)	155	3
DNA-directed RNA polymerase II largest subunit	(P24928)	1268	25
DNA-directed RNA polymerase II polypeptide 2	(Q753Q4)	655	15
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 17.1 k	(P52434)	61	1
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 7.0 kD	(P53803)	48	1
DnaJ homolog subfamily C member 13	(O75165)	245	4
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein	(P07153)	314	6
D-ribose-binding periplasmic protein precursor	(P0A2C6)	404	6
Dynactin-1 (150 kDa dynein-associated polypeptide)	(P28023)	63	1
Dynein heavy chain, cytosolic (DYHC)	(P38650)	2546	51
Dynein light chain 1, cytoplasmic	(P61285)	73	2
EF-hand domain-containing protein CG10641	(Q9VJ26)	58	1
EH-domain-containing protein 4	(Q9H223)	46	1
Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	(Q99LC5)	195	4
Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	(P25698)	542	12
Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	(P68103)	208	5
Elongation factor 1-alpha, somatic form	(P13549)	87	2
Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	(O70251)	518	9
Elongation factor 1-delta (EF-1-delta) (P36)	(P29693)	139	3
Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	(Q68FR6)	440	9
Elongation factor 2 (EF-2)	(P05086)	504	10
Endoplasmic precursor	(P08113)	498	10
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	(Q5E9H7)	98	2
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	(P68102)	86	1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(O15371)	121	2
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q99613)	345	8
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q8JZQ9)	156	4
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q14152)	832	17
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q9Y262)	226	4
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	(Q6NZJ6)	189	5
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	(Q6EWQ7)	140	2
Exportin-1 (Exp1) (Chromosome region maintenance 1	(Q6P5F9)	104	2
Exportin-5 (Exp5) (Ran-binding protein 21)	(Q924C1)	66	2
Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin-2)	(P31977)	1184	24
F-actin capping protein beta subunit (CapZ beta)	(P79136)	148	2
Far upstream element-binding protein 2	(Q92945)	107	2
Fatty acid synthase	(P12785)	1637	35
Filamin-A (Alpha-filamin) (Filamin-1)	(Q8BTM8)	1068	18
Filamin-B (FLN-B) (Beta-filamin)	(Q80X90)	1227	22
FK506-binding protein 1A	(Q62658)	71	1
FK506-binding protein 5	(Q13451)	71	2
Fructose-bisphosphate aldolase A	(P05065)	179	3
Galectin-3 (Galactose-specific lectin 3)	(P08699)	97	3
Ganglioside GM2 activator precursor (GM2-AP)	(Q60648)	70	1
GCN1-like protein 1 (HsGCN1)	(Q92616)	70	2
Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	(P13020)	110	2
Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	(Q28115)	49	1
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	(Q27638)	79	1
Glucosidase 2 beta subunit precursor	(O08795)	60	1
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor	(P00366)	200	5
Glutaredoxin-1 (Thioltransferase-1) (TTase-1)	(Q9ESH6)	353	6
Glutathione S-transferase 26 kDa	(P08515)	1726	31
Glutathione S-transferase Mu 2	(P15626)	819	14
Glutathione S-transferase P	(P04906)	1089	17

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Glutathione transferase omega-1	(Q9Z339)	233	4
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	(P04797)	704	14
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	(P35571)	198	4
Glycyl-tRNA synthetase	(Q10039)	303	7
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	(P04079)	84	2
GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor	(Q99LP6)	154	3
Guanine deaminase	(Q9WTT6)	127	2
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2	(P63243)	198	4
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 4	(Q9HAV0)	78	1
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	(Q7ZX41)	49	1
Heat shock 70-related protein 1	(P12076)	58	1
Heat shock cognate 71 kDa protein	(P19378)	1680	26
Heat shock protein 70 B2	(P41827)	320	6
Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	(P07901)	1003	9
Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84)	(Q9GKX8)	1243	23
Heat-shock protein 105 kDa	(Q92598)	117	1
HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1	(Q7Z6Z7)	72	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 homolog	(P51989)	53	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	(P61978)	251	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNP M)	(P52272)	494	11
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q)	(O60506)	133	2
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U)	(Q00839)	218	5
Hexokinase-1	(P05708)	173	3
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	(P70349)	92	2
Histidine triad nucleotide-binding protein 2	(Q9D0S9)	63	1
Histone H1.1 (Fragment)	(P02253)	85	2
Histone H2A	(P40281)	75	1
Histone H2A type 1-B	(P04908)	140	2
Histone H2B type 1-B (h2B-143)	(Q64475)	249	5
Histone H4	(P84048)	147	3
Huntingtin-interacting protein 1-related protein	(O75146)	102	2
Importin beta-1 subunit	(Q14974)	240	6
Importin beta-3 (Karyopherin beta-3)	(O00410)	222	5
Insulin-degrading enzyme	(P14735)	54	1
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein	(Q5SF07)	77	1
Integrin alpha-3 precursor (Galactoprotein B3)	(P17852)	104	2
Integrin beta-1 (Fibronectin receptor beta subunit)	(P53712)	159	3
Integrin beta-4 precursor (GP150) (CD104 antigen)	(P16144)	100	1
Interleukin-1 receptor antagonist protein precursor	(P25086)	71	1
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	(P41563)	125	3
Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BU30)	213	5
Kinesin heavy chain	(Q61768)	230	4
LanC-like protein 1	(Q9QX69)	256	7
Lethal(2) giant larvae protein homolog 2	(Q3TJ91)	120	2
Leucine-rich repeat-containing protein 59	(Q6NX28)	79	2
Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BMJ2)	357	7
Leukotriene A-4 hydrolase	(P24527)	53	1
L-lactate dehydrogenase	(P33571)	205	1
L-lactate dehydrogenase A chain	(P04642)	940	18
Lon protease homolog, mitochondrial precursor	(P36776)	65	2
Long-chain fatty acid transport protein 4	(Q91VE0)	171	3
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	(P15650)	146	3
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	(Q8JZR0)	62	2
Loss of heterozygosity 11 chromosomal region 2 gen	(Q75WE7)	190	4
Low-density lipoprotein receptor precursor	(P35952)	126	2
Low-density lipoprotein receptor-related protein 1	(Q07954)	140	2
Lysosomal protective protein precursor	(P16675)	78	2
Lysyl-tRNA synthetase	(Q8ZHK5)	106	2

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Macrophage capping protein	(P24452)	185	3
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	(P34884)	99	2
Major vault protein beta (MVP-beta)	(P54659)	47	1
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	(P14152)	253	4
Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	(P04636)	858	14
Mitochondria fission 1 protein ((Q9Y3D6)	82	2
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	(P97700)	236	4
Mitochondrial carrier homolog 2	(Q791V5)	68	1
Mitochondrial glutamate carrier 1 (GC-1)	(Q9H936)	116	2
Mitochondrial import inner membrane translocase	(Q9Y5J7)	49	1
Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	(Q16891)	160	4
Moesin (Membrane-organizing extension spike protein	(P26038)	569	12
Myb-binding protein 1A (PAR-interacting protein)	(O35821)	190	4
Myoferlin (Fer-1-like protein 3)	(Q9NZM1)	54	1
Myosin Ib (Myosin I alpha) (MMI-alpha) (MMIa)	(P46735)	133	2
Myosin Ic (Myosin I beta) (MMIb)	(Q9WTI7)	142	3
Myosin light polypeptide 6	(P60661)	257	5
Myosin regulatory light chain 2-A	(P13832)	112	2
Myosin-14 (Myosin heavy chain, nonmuscle IIc)	(Q6URW6)	385	6
Myosin-9 (Myosin heavy chain, nonmuscle IIa)	(Q62812)	1008	19
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex	(Q62425)	103	3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex	(Q9ERS2)	56	1
NADPH--cytochrome P450 reductase	(P16435)	59	1
NEDD8 precursor (Ubiquitin-like protein Nedd8)	(P61282)	53	2
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	(Q09666)	776	17
Neutral alpha-glucosidase AB precursor	(Q8BHN3)	64	2
NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	(Q9CWS0)	102	2
Nonspecific lipid-transfer protein	(P22307)	97	2
Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	(Q810Q5)	109	2
Nuclear pore membrane glycoprotein 210 precursor	(P11654)	310	7
Nucleoid-associated protein ndpA	(P67715)	454	7
Nucleolar RNA helicase 2	(Q9JIK5)	57	1
Nucleolin (Protein C23)	(P13383)	597	9
Nucleoprotein TPR	(P12270)	62	1
Nucleoside diphosphate kinase B	(P22392)	243	7
Outer capsid protein VP2	(Q00273)	51	1
Parathymosin	(P08814)	54	1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	(P10111)	581	12
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	(P24368)	103	2
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	(Q26516)	59	1
Periplakin	(Q9R269)	946	18
Peroxiredoxin-1	(Q63716)	678	14
Peroxiredoxin-2	(Q61171)	347	6
Peroxiredoxin-5, mitochondrial precursor	(Q9R063)	656	10
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	(Q9WVK3)	123	2
Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	(Q9Y285)	111	2
Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor	(Q8VEM8)	436	9
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP-1)	(P31044)	200	3
Phosphoglycerate kinase 1	(P50310)	68	2
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	(Q8NC51)	58	1
Plastin-1 (I-plastin) (Intestine-specific plastin)	(Q14651)	165	3
Plectin-1 (PLTN) (PCN)	(P30427)	209	6
Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein	(P61286)	145	3
Polymerase I and transcript release factor	(O54724)	82	1
Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB)	(P17225)	78	2
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	(Q6P2Q9)	126	3
Pre-mRNA-splicing factor 19 (PRP19/PSO4 homolog)	(Q5ZMA2)	48	1
Probable ADP-ribosylation factor	(Q9Y7Z2)	113	1

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Probable ergosterol biosynthetic protein 28	(Q9ERY9)	50	1
Profilin-1 (Profilin I)	(P62962)	607	9
Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6)	(Q8WUM4)	92	1
Programmed cell death protein 5 (TFAR19 protein)	(P56812)	86	1
Programmed cell death protein 8	(Q9JM53)	300	6
Prohibitin	(Q3T165)	656	12
Prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein B)	(Q99623)	927	17
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	(P57761)	105	2
Prolyl-tRNA synthetase	(P16659)	1195	20
Proteasome activator complex subunit 3	(Q5F3J5)	158	1
Proteasome subunit alpha type 1	(O42265)	60	2
Proteasome subunit alpha type 4	(P25789)	76	2
Proteasome subunit beta type 2	(P49721)	46	1
Proteasome subunit beta type 5 precursor	(P28074)	108	2
Proteasome subunit beta type 6 precursor	(P28073)	214	3
Protein diaphanous homolog 1	(O08808)	83	2
Protein disulfide-isomerase A3 precursor	(P11598)	321	7
Protein disulfide-isomerase A4 precursor	(P38659)	229	6
Protein disulfide-isomerase A6 precursor	(Q922R8)	255	4
Protein disulfide-isomerase precursor	(Q8R4U2)	307	6
Protein KIAA0196	(Q12768)	47	1
Protein KIAA1967 (Deleted in breast cancer gene 1)	(Q8N163)	293	6
Protein phosphatase 2C isoform gamma	(Q61074)	66	1
Protein phosphatase PP2A 55 kDa regulatory subunit	(P36872)	64	1
Protein S100-A10 (S100 calcium-binding protein A10)	(P05943)	93	1
Protein S100-A11 (S100 calcium-binding protein A11)	(Q6B345)	87	1
Protein S100-A4 (S100 calcium-binding protein A4)	(P05942)	247	5
Protein S100-A6 (S100 calcium-binding protein A6)	(P05964)	352	9
Protein S100-A8 (S100 calcium-binding protein A8)	(P05109)	158	3
Protein S100-A9 (S100 calcium-binding protein A9)	(P06702)	201	3
Protein transport protein Sec61 beta subunit	(P60467)	50	1
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	(P23606)	341	6
Proteolipid protein 2	(Q9R1Q7)	73	1
Prothymosin alpha [Contains: Thymosin alpha]	(P06302)	247	3
Purine nucleoside phosphorylase	(P00491)	89	2
Puromycin-sensitive aminopeptidase	(P55786)	191	3
Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17	(P84733)	65	1
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RN	(O43143)	58	1
Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor	(P52873)	97	2
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	(P11177)	226	4
Pyruvate kinase isozyme M1	(P11979)	1212	20
Ran GTPase-activating protein 1	(P46061)	118	2
Ran-binding protein 2 (RanBP2)	(Q9ERU9)	431	9
Ran-binding protein 2-like 6 (RanBP2L6)	(Q68DN6)	63	1
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	(Q9JKF1)	570	10
Ras-related protein Rab-10	(P24409)	121	1
Ras-related protein Rab-1A	(P62822)	242	4
Ras-related protein Rab-2A	(P61105)	110	2
Receptor expression-enhancing protein 5	(Q5RE33)	80	1
Rho-associated protein kinase 2	(Q28021)	172	4
Ribosomal protein L22-like 1	(Q6P5R6)	133	2
Ribosome-binding protein 1	(Q28298)	58	1
RuvB-like 1	(Q9Y265)	196	3
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase	(P13585)	72	1
Serine/threonine-protein phosphatase 2A	(P30153)	306	6
Serum albumin precursor	(P02768)	287	6
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	(O75368)	56	1
Short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	(Q9WVK7)	58	1

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Sideroflexin-1 (Tricarboxylate carrier protein)	(Q9H9B4)	93	1
Sideroflexin-3	(Q9JHY2)	363	5
Signal recognition particle 14 kDa protein (SRP14)	(P16255)	84	1
Small nuclear ribonucleoprotein G (snRNP-G)	(P62308)	176	3
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	(P62314)	151	2
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	(P62316)	53	1
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	(P62318)	91	2
Small ubiquitin-related modifier 2 precursor (SUMO-2)	(P61955)	82	2
S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	(Q9CQ65)	57	1
Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain	(P50997)	128	2
Sorcin (22 kDa protein) (CP-22) (V19)	(P05044)	152	4
Sorting nexin-2 (Transformation-related gene 9 protein)	(O60749)	162	3
Spectrin alpha chain, brain	(P16086)	600	12
Spectrin beta chain, brain 1	(Q62261)	803	16
Splicing factor 3B subunit 3	(Q15393)	200	3
Splicing factor, arginine/serine-rich 3	(P84103)	53	1
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	(P23246)	150	3
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-ce	(Q15020)	122	2
Staphylococcal nuclease domain-containing protein	(Q66X93)	383	6
STE20-like serine/threonine-protein kinase	(O08815)	241	5
Stress-70 protein, mitochondrial precursor	(P48721)	1274	19
Stress-induced-phosphoprotein 1 (STI1) (Hsc70/Hsp9)	(O54981)	129	2
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] alpha-chain	(Q9WUM5)	88	2
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	(Q9Z2I8)	146	2
Sulfated glycoprotein 1 precursor (SGP-1)	(P10960)	107	2
Sulfide:quinone oxidoreductase	(Q9R112)	453	8
Superkiller viralicidic activity 2-like 2	(P42285)	60	1
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	(P07632)	151	3
Talin-1	(Q9Y490)	549	11
TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)	(Q13148)	72	1
T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha)	(P18279)	309	5
T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta)	(P80314)	127	2
T-complex protein 1 subunit delta (TCP-1-delta)	(Q2T9X2)	262	6
T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon)	(Q5RF02)	143	3
T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta)	(Q2NKZ1)	89	2
T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma)	(Q3T0K2)	305	5
T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta)	(P42932)	598	10
T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta)	(Q3MHL7)	345	7
Thioredoxin	(P11232)	264	6
Thioredoxin-like protein 2	(Q9CQM9)	49	1
Thioredoxin-like protein 5	(Q9CQM5)	80	2
Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q5XHY5)	189	4
Tight junction protein ZO-1	(Q07157)	95	2
Transaldolase	(Q9EQS0)	335	7
Transcription elongation factor B polypeptide 2	(Q15370)	99	2
Transcription factor BTF3	(P20290)	77	1
Transcriptional activator protein Pur-alpha	(Q00577)	53	1
Transgelin-2 (SM22-alpha homolog)	(P37802)	473	9
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	(P55072)	589	12
Transketolase	(P50137)	1083	21
Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	(P79110)	239	5
Trifunctional enzyme alpha subunit, mitochondrial	(Q64428)	363	8
Trifunctional enzyme beta subunit, mitochondrial	(Q60587)	108	2
Tripeptidyl-peptidase 2	(Q9V6K1)	130	3
Trk system potassium uptake protein trkA (K(+))	(P0AGI8)	50	2
Tropomyosin alpha-4 chain (Tropomyosin-4) (TM-4)	(P09495)	461	13
Tubulin alpha-1 chain (Alpha-tubulin 1)	(P81948)	455	3
Tubulin alpha-ubiquitous chain	(P68363)	560	8

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Tubulin beta chain (Beta tubulin)	(P79008)	56	1
Tubulin beta-1 chain (Beta-tubulin isotype I)	(P69893)	872	15
Tubulin beta-2C chain	(Q3MHM5)	819	3
Tubulin beta-6 chain	(Q9BUF5)	185	1
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	(Q90687)	49	1
U1 small nuclear ribonucleoprotein A	(P09012)	47	1
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicas	(O75643)	116	2
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6	(P62312)	89	3
Ubiquitin	(P62990)	414	9
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	(P54578)	45	1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	(P45974)	188	3
Ubiquitin thioesterase protein OTUB1	(Q96FW1)	57	1
Ubiquitin-activating enzyme E1 1	(Q02053)	329	6
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	(P61077)	81	2
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	(P68036)	204	4
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N ((Q9EQX9)	77	2
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 (UEV-1)	(Q13404)	76	1
Ubiquitin-fold modifier 1 precursor	(Q803Y4)	60	1
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	(Q9JLA3)	164	4
UDP-glucuronosyltransferase 1-1 precursor	(Q63886)	139	3
UDP-glucuronosyltransferase 1-7 precursor	(Q64633)	203	4
UMP-CMP kinase (Cytidylate kinase)	(P30085)	103	3
Up-regulated during skeletal muscle growth protein	(Q9JJW3)	180	3
Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	(Q29048)	243	5
Vacuolar ATP synthase subunit E	(P11019)	67	1
Vacuolar ATP synthase subunit G 1	(O75348)	60	1
Vacuolar protein sorting 35	(Q9EQH3)	248	4
Valyl-tRNA synthetase	(Q97ZK9)	210	5
Very-long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	(P48818)	84	1
Vesicle transport protein GOT1A	(Q2NKV8)	46	1
Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP-8)	(O70404)	52	2
Vigilin	(P81021)	50	1
Vinculin (Metavinculin)	(P18206)	215	4
Voltage-dependent anion-selective channel protein	(Q60932)	122	2
Voltage-dependent anion-selective channel protein	(Q9R1Z0)	54	1
WD repeat protein 61	(Q32LN7)	53	1
WD-repeat protein 1 (Actin-interacting protein 1)	(O88342)	213	4
Xaa-Pro aminopeptidase 1	(Q9NQW7)	201	3
Zinc finger CDGSH domain-containing protein 1	(Q91WS0)	83	2

8.2 Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung B gebundene Proteine

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
1,4-alpha-glucan branching enzyme	(Q6T308)	62	1
10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	(P0A6G1)	400	8
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	(Q15029)	142	3
130 kDa leucine-rich protein (LRP 130) (GP130)	(P42704)	111	2
14-3-3 protein beta/alpha	(P35213)	512	5
14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	(P62261)	940	18
14-3-3 protein eta	(P68509)	406	4

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
14-3-3 protein gamma	(P68252)	908	18
14-3-3 protein theta (14-3-3 protein tau)	(P68254)	653	7
14-3-3 protein zeta/delta	(P63101)	710	13
15 kDa selenoprotein precursor	(Q802F3)	194	3
150 kDa oxygen-regulated protein precursor	(Q60432)	92	3
1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	(Q01970)	53	1
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial precursor	(Q64591)	155	3
26S protease regulatory subunit 4 (P26s4)	(Q90732)	410	8
26S protease regulatory subunit 6A	(Q63569)	125	2
26S protease regulatory subunit 6A-A	O42587	170	3
26S protease regulatory subunit 6B homolog	(Q9SEI4)	503	10
26S protease regulatory subunit 7	(Q63347)	54	1
26S protease regulatory subunit 8	(P34124)	329	6
26S protease regulatory subunit S10B	(P62333)	394	6
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	(Q99460)	779	14
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	(Q8BG32)	72	2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	(O00232)	182	3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	(Q9UNM6)	201	4
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	(Q9LT08)	234	3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	(Q8VDM4)	1011	17
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	(P14685)	489	8
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	(Q8BJY1)	138	3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	(Q15008)	339	6
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	(P51665)	195	4
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	(Q9CX56)	149	3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	(Q9WTV5)	73	2
28S ribosomal protein S25, mitochondrial	(Q4QR80)	61	1
28S ribosomal protein S35, mitochondrial precursor	(Q8BJZ4)	128	1
3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	(Q9Z1N4)	182	4
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	(P23965)	50	1
30S ribosomal protein S15	(P0ADZ5)	123	3
30S ribosomal protein S2	(P0A7V2)	299	6
30S ribosomal protein S21	(P68681)	149	2
30S ribosomal protein S3	(P47403)	701	13
30S ribosomal protein S6	(P0A4D1)	160	4
39S ribosomal protein L11, mitochondrial precursor	(Q5XIE3)	72	1
39S ribosomal protein L12, mitochondrial precursor	(P52827)	136	4
39S ribosomal protein L19, mitochondrial precursor	(Q9D338)	51	1
39S ribosomal protein L40, mitochondrial precursor	(Q9Z2Q5)	76	2
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	(P29266)	506	9
3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal precursor	(Q921H8)	73	2
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	(P13437)	596	10
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	(Q99J99)	131	2
40S ribosomal protein S10	(P63325)	358	9
40S ribosomal protein S11	(P62280)	325	6
40S ribosomal protein S13	(Q56JX8)	417	11
40S ribosomal protein S14	(P48150)	161	4
40S ribosomal protein S15a	(P62244)	291	7
40S ribosomal protein S16	(P62249)	420	9
40S ribosomal protein S17	(P63273)	225	5
40S ribosomal protein S18	(Q3T0R1)	549	10
40S ribosomal protein S19	(P39019)	689	14
40S ribosomal protein S20	(P60866)	219	4
40S ribosomal protein S23	(P62298)	137	2
40S ribosomal protein S24	(Q56JU9)	127	2
40S ribosomal protein S25	(Q56JX5)	302	5
40S ribosomal protein S26	(P30742)	157	3
40S ribosomal protein S27-like protein	(Q3T0B7)	53	1

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
40S ribosomal protein S28	(Q6PBK3)	192	3
40S ribosomal protein S3a (EtS3a)	(O43999)	504	11
40S ribosomal protein S4, X isoform	(Q76N24)	471	10
40S ribosomal protein S5-A	(O14277)	54	1
40S ribosomal protein S7	(Q5RT64)	371	9
40S ribosomal protein S9	(Q20228)	310	8
40S ribosomal protein S9-A	(Q09757)	60	1
40S ribosomal protein SA (p40) (C10 protein)	(P26452)	438	6
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	(Q9JLJ3)	340	7
50S ribosomal protein L13	(P0AA12)	89	1
50S ribosomal protein L21	(P0AG49)	159	5
50S ribosomal protein L3	(P10134)	122	3
50S ribosomal protein L6	(P0AG57)	75	1
50S ribosomal protein L7/L12 (L8)	(P0A7K4)	555	12
5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit	(Q13131)	98	2
60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	(P10155)	57	1
60S acidic ribosomal protein P0 (L10E) (Fragment)	(Q95140)	620	9
60S acidic ribosomal protein P2	(P02401)	401	7
60S ribosomal protein L11	(Q6QMZ8)	334	5
60S ribosomal protein L12	(P23358)	224	4
60S ribosomal protein L17	(Q5XTY7)	207	4
60S ribosomal protein L18a	(P62717)	165	4
60S ribosomal protein L22	(P35268)	283	5
60S ribosomal protein L23 (Ribosomal protein L17)	(P62829)	199	4
60S ribosomal protein L23a	(P62750)	191	4
60S ribosomal protein L24 (Ribosomal protein L30)	(Q862I1)	118	2
60S ribosomal protein L26	(P61257)	367	9
60S ribosomal protein L27	(P61356)	245	5
60S ribosomal protein L27a	(P18445)	129	3
60S ribosomal protein L28	(P46779)	210	4
60S ribosomal protein L30	(P58372)	147	3
60S ribosomal protein L30-2	(Q8VZ19)	49	1
60S ribosomal protein L31	(P62899)	212	5
60S ribosomal protein L34	(Q7ZWJ7)	116	3
60S ribosomal protein L35	(Q3MHM7)	137	3
60S ribosomal protein L35a	(P18077)	296	6
60S ribosomal protein L36	(Q3T171)	114	2
60S ribosomal protein L36a	(Q3SZ59)	66	1
60S ribosomal protein L38	(P63173)	83	2
60S ribosomal protein L7a	(P32429)	277	5
60S ribosomal protein L8	(P62917)	320	5
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	(P78812)	300	5
6-phosphogluconolactonase	(Q9CQ60)	95	2
78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor	(P36604)	1342	22
Acetyl-CoA carboxylase	(P11029)	64	2
Acid ceramidase precursor	(Q9WV54)	116	3
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32	(O35381)	397	8
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32	(Q9EST5)	369	8
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32	(Q9BTT0)	62	1
Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	(Q99KI0)	680	11
Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	(P62739)	249	5
Actin, clone 205	(P18600)	86	1
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	(P60712)	1113	20
Actin, cytoplasmic type 8	(P53506)	1272	19
Actin-2	(Q9Y707)	1000	1
Actin-3	(P46258)	594	1
Actin-3-sub 2	(P07828)	170	3
Actin-like protein (Centractin)	(P38673)	167	2

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Actin-like protein 2 (Actin-related protein 2)	(P61160)	469	8
Actin-like protein 3 (Actin-related protein 3)	(P61157)	415	8
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	(Q9WV32)	307	6
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	(O15144)	677	13
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	(O15145)	282	5
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	(P59998)	283	6
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	(O15511)	290	4
Activated RNA polymerase II transcriptional	(P11031)	174	2
Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase	(Q8BK64)	198	4
Acyl-CoA dehydrogenase family member 9	(Q8JZN5)	125	3
Acyl-CoA-binding protein (ACBP)	(P11030)	350	9
Acyl-coenzyme A oxidase 1, peroxisomal	(P07872)	86	1
Acyl-coenzyme A thioesterase 2	(O55171)	91	1
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial precursor	(Q9R0X4)	147	3
Acyl-protein thioesterase 1	(P70470)	94	3
Adenine phosphoribosyltransferase	(Q64414)	63	2
Adenosylhomocysteinase	(O67240)	668	12
Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	(P29410)	179	3
Adenylosuccinate lyase	(P54822)	70	2
Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	(Q8N142)	63	1
Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	(P46664)	57	1
Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1)	(P40124)	504	9
ADP/ATP translocase 2	(P05141)	365	8
ADP-ribosylation factor 1	(P84080)	357	7
ADP-ribosylation factor 1-like 2	(Q10943)	402	7
ADP-ribosylation factor 4	(P61750)	340	2
ADP-ribosylation factor 5	(P84085)	368	7
ADP-ribosylation factor 6	(P26990)	283	3
ADP-ribosylation factor-like protein 1	(P40616)	282	5
ADP-ribosylation factor-like protein 2	(P36404)	53	1
ADP-ribosylation factor-like protein 6	(Q9H0F7)	65	1
ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1	(Q15041)	51	1
ADP-ribosylation factor-like protein 8A	(Q5ZKQ8)	123	2
ADP-ribosylation factor-like protein 8B	(Q2KI07)	429	7
ADP-sugar pyrophosphatase	(Q6AY63)	211	4
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 1	(P38918)	58	1
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	(Q8CG45)	81	1
Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BGQ7)	468	9
Alcohol dehydrogenase [NADP+]	(P51635)	511	9
Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	(P49419)	330	4
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	(P81178)	1074	19
Aldo-keto reductase family 1 member B10	(O60218)	232	1
Aldo-keto reductase family 1 member C13	(P82809)	60	1
Aldose reductase	(P16116)	335	8
Aldose reductase-related protein 1	(P21300)	179	1
Aldose reductase-related protein 2	(P45377)	283	5
Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase	(Q9EQR2)	58	1
Allophycocyanin alpha chain 2	(P16572)	48	1
Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin)	(P02511)	102	2
Alpha-actinin-1	(Q9Z1P2)	1681	16
Alpha-actinin-4	(P57780)	1895	38
Alpha-enolase	(P04764)	1026	20
Alpha-lactalbumin precursor	(Q9TSR4)	49	1
Alpha-mannosidase 2C1	(P21139)	183	4
Alpha-N-acetylgalactosaminidase precursor	(Q66H12)	94	2
Alpha-S1-casein precursor	(P02662)	497	8
Alpha-S2-casein precursor	(P02663)	315	8
Alpha-soluble NSF attachment protein (SNAP-alpha)	(P81125)	184	3

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Aminoacylase-1	(P37111)	64	1
Aminopeptidase B	(O09175)	241	5
Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region	(Q8NDH6)	52	1
Anaphase-promoting complex subunit 4 (APC4)	(Q91W96)	63	1
Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein	(Q810B6)	60	1
Ankyrin repeat domain-containing protein 30A	(Q9BXX3)	54	1
Annexin A1 (Annexin I) (Lipocortin I)	(P10107)	131	1
Annexin A13 (Annexin XIII)	(P27216)	182	4
Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II)	(Q07936)	912	17
Annexin A3 (Annexin III) (Lipocortin III)	(P14669)	1067	20
Annexin A4 (Annexin IV) (Lipocortin IV)	(P55260)	696	10
Annexin A5 (Annexin V) (Lipocortin V)	(P14668)	1123	20
Annexin A8 (Annexin VIII)	(O35640)	669	13
AP-1 complex subunit beta-1	(Q10567)	217	5
AP-1 complex subunit gamma-1	(O43747)	164	3
AP-2 complex subunit alpha-2	(P18484)	370	7
AP-2 complex subunit beta-1	(P63010)	333	6
AP-2 complex subunit mu-1	(Q96CW1)	64	2
AP-2 complex subunit sigma-1	(P53680)	74	2
AP-3 complex subunit beta-1	(Q9Z1T1)	156	4
Apoptosis regulator BAX, membrane isoform alpha	(Q07813)	225	3
Apoptosis regulator Bcl-X (Bcl-2-like 1 protein)	(Q07817)	55	1
Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(P37880)	462	9
Arylamine N-acetyltransferase 1	(P50297)	54	1
Arylsulfatase B	(P50430)	49	1
Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	(Q5ZJU3)	468	10
Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BP47)	98	2
Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	(P13221)	313	6
Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor	(P05202)	219	3
Aspartyl aminopeptidase	(Q9Z2W0)	134	4
Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q3SYZ4)	255	6
Astrocytic phosphoprotein PEA-15	(Q9Z297)	107	2
ATP synthase beta chain	(P0ABB4)	949	17
ATP synthase D chain, mitochondrial	(P31399)	195	3
ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor	(P05630)	121	2
ATP synthase epsilon chain, mitochondrial	(P05632)	76	2
ATP synthase f chain, mitochondrial	(P56135)	53	1
ATP synthase gamma chain, mitochondrial.	(P35435)	311	6
ATP synthase O subunit, mitochondrial precursor	(Q06647)	615	12
ATP synthase protein 8	(P11608)	108	3
ATP synthase subunit alpha	(Q89X72)	1405	22
ATPase family AAA domain-containing protein 3	(Q92511)	158	3
ATPase family AAA domain-containing protein 3A	(Q9NVI7)	69	1
ATPase inhibitor, mitochondrial precursor	(Q9UII2)	46	2
ATP-binding cassette sub-family B member 7	(Q61102)	165	3
ATP-binding cassette sub-family E member 1	(P61221)	360	7
ATP-citrate synthase	(P53396)	923	14
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	(P32807)	63	1
ATP-dependent RNA helicase DDX1	(Q92499)	82	1
ATP-dependent RNA helicase DDX19A	(Q61655)	150	4
ATP-dependent RNA helicase DDX39	(O00148)	196	4
Autophagy-related protein 3 (APG3-like)	(Q6GQE7)	72	1
Beta-2-microglobulin precursor	(P07151)	61	1
Beta-casein precursor	(P02666)	237	7
Beta-hexosaminidase subunit alpha precursor	(Q641X3)	49	1
Beta-lactoglobulin precursor (Beta-LG)	(P02754)	685	13
Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	(Q8CGC7)	1095	20
Bifunctional protein NCOAT	(O60502)	185	4

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	(P31335)	422	8
Biliverdin reductase A precursor	(P46844)	143	2
BolA-like protein 2	(Q8BGS2)	143	3
Branched-chain-amino-acid aminotransferase	(O35854)	77	1
BR13-binding protein (I3-binding protein)	(Q8BXV2)	74	1
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	(Q922D8)	640	12
CAD protein	(Q91437)	1098	21
Cadherin-17 precursor (Liver-intestine-cadherin)	(P55281)	166	3
Calcineurin subunit B isoform 1	(P63099)	70	1
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aral	(Q9QXX4)	76	2
Calcium-binding protein 39	(Q29RI6)	105	3
Calcium-regulated heat stable protein 1	(Q9Y2V2)	90	2
Calcyclin-binding protein (CacyBP)	(Q9CXW3)	149	3
Calmodulin-alpha (CaM A) (Fragment)	(P62146)	277	6
Calnexin precursor	(P35565)	597	12
Calpain-1 catalytic subunit	(P07384)	135	2
Calpain-2 catalytic subunit precursor	(Q9GLG1)	546	11
Calreticulin precursor	(P18418)	261	7
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha	(P12367)	101	2
Carbonic anhydrase 13	(Q9D6N1)	59	1
Carbonyl reductase [NADPH] 1	(P47727)	854	13
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial precursor	(P18886)	308	6
Carnitine O-palmitoyltransferase I, liver isoform	(P97742)	407	7
Casein kinase I isoform alpha-like	(Q8N752)	49	1
Casein kinase II subunit alpha	(P68399)	54	1
Caspase recruitment domain-containing protein 9	(Q9EPY0)	82	1
Caspase-6 precursor	(O08738)	62	1
Catechol O-methyltransferase	(P22734)	107	2
Catenin alpha-1	(P26231)	315	5
Cathepsin B precursor (EC 3.4.22.1) (Cathepsin B1)	(P00787)	71	1
Cathepsin D precursor	(P24268)	288	7
CD59 glycoprotein precursor	(P27274)	59	1
CD9 antigen	(P40241)	125	4
CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransfe	(O14735)	161	3
Cell differentiation protein rcd1	(Q92368)	61	1
Cell division control protein 42 homolog	(Q90694)	250	5
Cell division cycle protein 16 homolog	(Q8R349)	53	1
Chaperone clpB	(Q889C2)	282	4
Charged multivesicular body protein 4b	(Q9H444)	48	1
Chloride intracellular channel protein 1	(O00299)	344	7
Chloride intracellular channel protein 4	(Q9XSA7)	126	2
Chloride intracellular channel protein 5	(P35526)	61	1
Chloroplast 30S ribosomal protein S9	(Q9TLV4)	67	1
Choline-phosphate cytidyltransferase A	(P49585)	163	3
Chromobox protein homolog 3	(Q13185)	66	2
Cingulin	(P59242)	186	5
Citrate synthase, mitochondrial precursor	(Q29RK1)	216	4
Clathrin heavy chain	(Q68FD5)	2768	49
Clathrin light chain A (Lca)	(P09496)	197	4
Clathrin light chain B (Lcb)	(P09497)	168	3
Claudin-1	(P56745)	171	2
Claudin-3	(Q9Z0G9)	298	6
Claudin-4	(Q6BBL6)	78	2
C-Myc-binding protein (Associate of Myc 1) (AMY-1)	(Q99417)	53	1
Coactosin-like protein	(Q14019)	280	7
Coatamer subunit alpha (Alpha-coat protein)	(Q27954)	1020	23
Coatamer subunit beta' (Beta'-coat protein)	(P35605)	710	12
Coatamer subunit beta (Beta-coat protein)	(P53618)	896	18

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Coatomer subunit delta (Delta-coat protein)	(P53619)	280	5
Coatomer subunit epsilon (Epsilon-coat protein)	(O89079)	229	4
Coatomer subunit gamma (Gamma-coat protein)	(P53620)	304	5
Coatomer subunit gamma-2	(Q9QXK3)	164	3
COBW domain-containing protein 1	(Q99MB4)	59	1
Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform)	(P18760)	465	7
Cofilin-2 (Cofilin, muscle isoform)	(Q9Y281)	268	2
Coiled-coil domain-containing protein 93	(Q5BJT7)	70	1
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	(O35658)	160	2
Conserved oligomeric Golgi complex component 1	(Q9Z160)	54	1
Conserved oligomeric Golgi complex subunit 6	(Q68FP9)	47	1
COP9 signalosome complex subunit 1	(Q13098)	46	1
COP9 signalosome complex subunit 4	(Q68FS2)	84	1
COP9 signalosome complex subunit 6	(Q7L5N1)	94	2
COP9 signalosome complex subunit 7a	(Q9UBW8)	59	1
Coproporphyrinogen III oxidase	(P36551)	146	3
Coronin-1B (Coronin-2)	(Q9BR76)	103	3
Coronin-1C	(Q9WUM4)	51	1
Coronin-like protein crn1	(O13923)	94	3
CTP synthase 1	(P70698)	358	6
Cullin-1 (CUL-1)	(Q13616)	97	2
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	(Q86VP6)	1008	22
Cystathionine gamma-lyase	(Q8VCN5)	348	5
Cystatin B (Liver thiol proteinase inhibitor)	(P01041)	191	5
Cysteine-rich protein 1	(P63254)	71	2
Cytochrome b5 (Fragment)	(P00168)	172	4
Cytochrome b5 type B precursor	(P04166)	95	2
Cytochrome c oxidase assembly protein COX15	(Q8BJ03)	74	1
Cytochrome c oxidase copper chaperone	(P56394)	46	1
Cytochrome c oxidase polypeptide Va, mitochondrial	(P00426)	173	3
Cytochrome c oxidase polypeptide Vb	(P00428)	116	3
Cytochrome c oxidase polypeptide VIIa-liver/heart	(P35171)	61	1
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	(P10888)	309	7
Cytochrome c, somatic	(P62897)	430	8
Cytochrome P450 51A1	(Q64654)	95	2
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	(Q9Y6G9)	158	3
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	(Q6PDL0)	64	1
Cytosol aminopeptidase	(P28838)	146	3
Cytosolic nonspecific dipeptidase	(Q9D1A2)	745	13
Cytosolic purine 5'-nucleotidase	(P49902)	63	2
D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial precursor	(P84850)	103	2
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	(O08651)	178	4
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondria	(P29147)	106	2
D-dopachrome decarboxylase	(P80254)	354	7
Dehydrogenase/reductase SDR family member 7 precursor	(Q9CXR1)	65	1
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	(Q8CHT0)	233	4
Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase	(Q62651)	445	8
Delta-aminolevulinic acid dehydratase	(P13716)	214	4
Desmocollin-1 precursor (Desmosomal glycoprotein 2)	(Q08554)	73	1
Desmoglein-1 precursor (Desmosomal glycoprotein 1)	(Q02413)	153	2
Desmoplakin (DP)	(P15924)	591	12
Destrin (Actin-depolymerizing factor) (ADF)	(Q9R0P5)	394	7
Diablo homolog, mitochondrial precursor	(Q9JIQ3)	115	3
Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2)	(O02675)	325	6
Dihydroxyacetone kinase	(Q4KLZ6)	86	2
Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase	(Q9ES71)	302	7
Dipeptidyl-peptidase 3	(Q9NY33)	420	8
DNA damage-binding protein 1	(P33194)	1342	30

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
DNA mismatch repair protein Msh2	(P43247)	97	2
DNA replication licensing factor MCM2	(P97310)	105	2
DNA replication licensing factor mcm4-A	(Q5XK83)	62	1
DNA replication licensing factor MCM6	(Q2KIZ8)	85	2
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	(P43138)	146	3
DNA-directed RNA polymerase I largest subunit	(O95602)	46	1
DNA-directed RNA polymerase II 14.5 kDa polypeptid	(P36954)	86	1
DNA-directed RNA polymerase II 16 kDa polypeptide	(O15514)	134	2
DNA-directed RNA polymerase II 33 kDa polypeptide	(P97760)	302	5
DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide	(Q6QN04)	71	2
DNA-directed RNA polymerase II largest subunit	(P24928)	1954	40
DNA-directed RNA polymerase II polypeptide 2	(Q753Q4)	928	21
DNA-directed RNA polymerase II subunit J	(P52435)	154	3
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 14.4 k	(P61217)	63	2
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 17.1 k	(P52434)	205	3
DnaJ homolog subfamily A member 1	(P63036)	183	3
DnaJ homolog subfamily A member 2	(O35824)	216	5
DnaJ homolog subfamily A member 3	(Q99M87)	79	2
DnaJ homolog subfamily B member 10 (mDJ8)	(Q9QY15)	61	1
DnaJ homolog subfamily B member 11 precursor	(Q9UBS4)	89	2
DnaJ homolog subfamily B member 4	(Q9UDY4)	48	1
DnaJ homolog subfamily C member 13	(O75165)	118	2
Dolichol-phosphate mannosyltransferase	(Q9WU83)	256	5
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosy	(P07153)	551	10
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	(O54734)	97	2
Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	(Q9Y673)	48	1
Dual specificity protein phosphatase 4	(Q62767)	65	1
Dynactin subunit 3 (Dynactin light chain p24)	(Q9Z0Y1)	175	4
Dynactin-1 (150 kDa dynein-associated polypeptide)	(P28023)	180	3
Dynammin-1-like protein	(O35303)	79	1
Dynammin-2	(P50570)	467	10
Dynein heavy chain, cytosolic (DYHC)	(P38650)	2936	65
Dynein light chain 1, cytoplasmic	(P61285)	128	3
Dynein light chain 2A, cytoplasmic	(P62627)	112	2
Dynein light chain Tctex-type 1	(P63171)	108	2
E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	(P46935)	199	5
EF-hand domain-containing protein 2 (Swiprosin-1)	(Q96C19)	441	8
EH-domain-containing protein 1 (Testilin) (hPAST1)	(Q9H4M9)	78	2
EH-domain-containing protein 4	(Q9H223)	171	4
Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	(Q99LC5)	611	11
Electron transfer flavoprotein subunit beta	(Q2TBV3)	76	2
Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	(P25698)	883	16
Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	(P68103)	425	9
Elongation factor 1-alpha, somatic form	(P13549)	294	7
Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	(O70251)	891	15
Elongation factor 1-delta (EF-1-delta) (P36)	(P29693)	165	3
Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	(Q68FR6)	1287	22
Elongation factor 2 (EF-2)	(P05086)	1468	28
Elongation factor G 1 (EF-G 1)	(Q39KH0)	78	1
Endonuclease domain-containing 1 protein precursor	(Q8C522)	127	2
Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	(P30040)	77	2
Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment	(Q969X5)	114	2
Endoplasmin precursor	(P08113)	1140	22
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	(Q8BH95)	61	1
Epidermal growth factor receptor kinase substrate	(Q99K30)	153	4
ER lumen protein retaining receptor 1	(P33946)	115	2
ERGIC-53 protein precursor	(Q9D0F3)	52	2

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	(Q5E9H7)	115	2
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	(P50171)	62	1
Eukaryotic initiation factor 4A-I	(P60843)	399	8
Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon	(Q9D1M4)	115	3
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	(P68102)	303	5
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	(P41091)	88	2
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q66JS6)	63	1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q5E966)	161	3
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q56JZ5)	51	1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(O00303)	105	2
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(O15371)	60	1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q99613)	340	6
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q8JZQ9)	328	6
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q14152)	817	15
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q9Y262)	406	9
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	(Q6NZJ6)	135	3
Eukaryotic translation initiation factor 4E-bindin	(P70445)	59	1
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	(Q6EWQ7)	320	6
Exocyst complex component 4	(Q96A65)	56	1
Exocyst complex component 5	(P97878)	51	1
Exosome complex exonuclease RRP45	(Q4QR75)	83	2
Exportin-1 (Exp1)	(Q6P5F9)	801	16
Exportin-2 (Exp2) (Importin-alpha re-exporter)	(P55060)	978	18
Exportin-5 (Exp5) (Ran-binding protein 21)	(Q924C1)	148	3
Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin-2)	(P31977)	136	3
Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50	(Q9JJ19)	152	3
F-actin capping protein alpha-1 subunit	(P47753)	245	3
F-actin capping protein alpha-2 subunit	(P47754)	312	6
F-actin capping protein beta subunit (CapZ beta)	(P79136)	541	8
FAM75-like protein C9orf79	(Q6ZUB1)	51	1
Far upstream element-binding protein 2	(Q92945)	119	2
Farnesyl pyrophosphate synthetase (FPP synthetase)	(P05369)	328	6
Fatty acid synthase	(P12785)	2668	51
Fatty acid-binding protein, epidermal (E-FABP)	(P55053)	141	3
F-box only protein 21	(Q8VDH1)	186	3
Filaggrin	(P20930)	88	2
Filamin-A (Alpha-filamin) (Filamin-1)	(Q8BTM8)	725	14
Filamin-B (FLN-B) (Beta-filamin)	(Q80X90)	865	16
FK506-binding protein 1A	(Q62658)	115	2
FK506-binding protein 2 precursor	(P26885)	47	1
FK506-binding protein 3	(Q62446)	246	5
FK506-binding protein 4	(P30416)	236	6
FK506-binding protein 5	(Q13451)	302	6
Fructose-bisphosphate aldolase A	(P05065)	940	16
Fusion glycoprotein F0 precursor	(P06828)	70	1
Galactokinase	(Q9R0N0)	85	1
Galectin-3 (Galactose-specific lectin 3)	(P08699)	394	8
Galectin-4 (Lactose-binding lectin 4)	(P38552)	57	2
Ganglioside GM2 activator precursor (GM2-AP)	(Q60648)	199	4
GCN1-like protein 1 (HsGCN1)	(Q92616)	146	3
Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	(P13020)	373	7
General vesicular transport factor p115	(P41541)	403	7
Glia maturation factor beta (GMF-beta)	(P60984)	91	2
Glucokinase (EC 2.7.1.2) (Glucose kinase)	(P0A6V8)	75	1
Glucosamine-6-phosphate isomerase	(Q64422)	365	6
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	(Q27638)	184	6
Glucose-6-phosphate isomerase	(P06745)	343	7
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor	(P00366)	751	16

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Glutaredoxin-1 (Thioltransferase-1)	(Q9ESH6)	332	5
Glutaredoxin-2, mitochondrial precursor	(Q6AXW1)	79	1
Glutathione reductase, mitochondrial precursor	(P47791)	183	4
Glutathione S-transferase 26 kDa	(P08515)	1873	31
Glutathione S-transferase 26 kDa	(P35661)	398	2
Glutathione S-transferase alpha-3	(P04904)	297	7
Glutathione S-transferase Mu 2	(P15626)	1389	25
Glutathione S-transferase Mu 5	(P46439)	486	7
Glutathione S-transferase P	(P04906)	1015	15
Glutathione S-transferase Y1	(Q00285)	162	3
Glutathione synthetase	(P46413)	411	9
Glutathione transferase omega-1	(Q9Z339)	313	6
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	(P04797)	1116	20
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	(P35571)	764	15
Glycogen [starch] synthase, liver	(P17625)	55	1
Glycyl-tRNA synthetase	(Q10039)	733	16
GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor	(Q99LP6)	127	2
GTPase HRas precursor (Transforming protein p21)	(P08642)	61	1
GTP-binding protein Rheb	(Q56JV3)	130	2
GTP-binding protein ryh1	(P17608)	112	1
GTP-binding protein SAR1a	(Q3T0D7)	111	2
Guanine deaminase	(Q9WTT6)	963	18
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2	(P63243)	491	8
Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-1	(P63097)	203	3
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T)	(P62871)	152	2
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T)	(P62879)	271	5
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	(Q7ZX41)	72	1
Heat shock 70 kDa protein (HSP 70.1)	(P16019)	1625	1
Heat shock 70 kDa protein cognate 1	(P29843)	171	2
Heat shock 70 kDa protein cognate 2	(P11146)	279	2
Heat shock 70-related protein 1	(P12076)	744	2
Heat shock cognate 71 kDa protein	(P19378)	2576	44
Heat shock protein 70 B2	(P41827)	1117	22
Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	(P07901)	2248	20
Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84)	(Q9GKX8)	2512	46
Heat-shock protein 105 kDa	(Q92598)	343	4
Hepatoma-derived growth factor (HDGF)	(P51859)	268	7
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP)	(Q99020)	61	2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F)	(P52597)	345	6
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	(P61978)	268	5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNP M)	(P52272)	806	15
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q)	(O60506)	155	3
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	(P22626)	70	2
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U)	(Q00839)	318	8
Hexokinase-1 (EC 2.7.1.1) (Hexokinase type I)	(P05708)	793	17
Hexokinase-2 (EC 2.7.1.1) (Hexokinase type II)	(O08528)	150	2
High mobility group protein B1	(P10103)	298	6
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	(P70349)	112	2
Histidine triad nucleotide-binding protein 2	(Q9D0S9)	99	2
Histone H2A	(P40281)	77	2
Histone H2A type 1-A	(Q96QV6)	93	1
Histone H2B 1.1 (H2B1.1)	(P02281)	79	2
Histone H2B 1.2 (H2B1.2)	(P06900)	85	2
Histone H2B type 1-B (h2B-143)	(Q64475)	336	6
Histone H4	(P84048)	92	2
Hornerin	(Q86YZ3)	136	3
Hsc70-interacting protein (Hip)	(P50503)	209	5
Huntingtin-interacting protein 1-related protein	(O75146)	292	7

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Hydroquinone glucosyltransferase	(Q9AR73)	46	1
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	(P97519)	364	6
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	(P0A9M2)	327	5
Import inner membrane translocase subunit TIM44	(O35857)	97	1
Import inner membrane translocase subunit TIM50	(Q9D880)	256	4
Importin alpha-1 subunit	(P52294)	64	1
Importin beta-1 subunit	(Q14974)	534	11
Importin beta-3 (Karyopherin beta-3)	(O00410)	528	10
Importin-4 (Importin 4a) (Imp4a)	(Q8VI75)	85	2
Importin-7 (Imp7) (Ran-binding protein 7) (RanBP7)	(O95373)	321	6
Importin-9 (Importin 9a) (Imp9a) (Importin 9b)	(Q91YE6)	319	5
Inosine triphosphate pyrophosphatase	(Q9BY32)	52	1
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	(P50096)	51	1
Inositol monophosphatase	(P97697)	107	2
Insulin-degrading enzyme	(P14735)	519	13
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein	(Q5SF07)	348	6
Integrin alpha-3 precursor (Galactoprotein B3)	(P17852)	167	3
Integrin alpha-6 precursor (VLA-6) (CD49f antigen)	(Q61739)	84	2
Integrin beta-1 (Fibronectin receptor beta subunit)	(P53712)	210	4
Integrin beta-1-A precursor	(P12606)	54	1
Interleukin enhancer-binding factor 2	(Q7TP98)	110	2
Interleukin-1 receptor antagonist protein precursor	(P25086)	235	5
Interleukin-18 precursor (IL-18) (Interferon-gamma)	(P97636)	205	5
Iron-responsive element-binding protein 1	(Q63270)	306	6
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	(P41563)	426	9
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta	(O77784)	113	2
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma	(P51553)	73	3
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	(P41562)	366	3
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	(P54071)	529	11
Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BU30)	610	13
Isoleucyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor	(Q8BIJ6)	144	3
Junction plakoglobin (Desmoplakin-3) (Desmoplakin)	(Q8SPJ1)	501	10
Kappa-casein precursor	(P02668)	195	3
Keratin, type I cuticular Ha1	(Q15323)	507	1
Keratin, type I cuticular Ha3-II	(Q14525)	467	2
Keratin, type I cuticular Ha5	(Q92764)	339	2
Keratin, type I microfibrillar 48 kDa,	(P02534)	931	16
Keratin, type I microfibrillar, 47.6 kDa	(P25690)	860	6
Keratin, type II cuticular Hb4	(Q9NSB2)	231	1
Keratin, type II cuticular Hb5	(Q9Z2T6)	652	3
Keratin, type II cuticular Hb6	(P97861)	439	1
Keratin, type II microfibrillar	(P02539)	595	2
Keratin, type II microfibrillar, component 5	(P25691)	784	6
Keratin, type II microfibrillar, component 7C	(P15241)	864	15
Kinesin heavy chain	(Q61768)	374	7
Kinesin light chain 1	(P37285)	68	1
Lactadherin precursor	(Q95114)	59	1
LanC-like protein 1	(Q9QX69)	354	8
LanC-like protein 2	(Q9JJK2)	60	1
Latexin (Endogenous carboxypeptidase inhibitor)	(P70202)	52	1
Lethal(2) giant larvae protein homolog 2	(Q3TJ91)	289	7
Leucine-rich repeat-containing protein 59	(Q6NX28)	122	2
Leucyl-cystinyl aminopeptidase	(P97629)	59	1
Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BMJ2)	679	14
Leukocyte elastase inhibitor (LEI) (Serpine B1)	(P30740)	135	2
Leukotriene A-4 hydrolase	(P24527)	786	13
LIM and SH3 domain protein 1 (LASP-1) (MLN 50)	(Q14847)	55	2
Lipoamide acyltransferase component of branched-ch	(P53395)	172	5

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
L-lactate dehydrogenase	(P33571)	293	1
L-lactate dehydrogenase A chain	(P04642)	1095	22
L-lactate dehydrogenase B chain	(P42119)	376	6
Lon protease homolog, mitochondrial precursor	(P36776)	450	9
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	(P15650)	1057	18
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	(Q8JZR0)	346	6
Loss of heterozygosity 11 chromosomal region 2 gen	(Q75WE7)	527	10
Low-density lipoprotein receptor precursor	(P35952)	191	3
Low-density lipoprotein receptor-related protein 1	(Q07954)	276	6
LYR motif-containing protein 4	(Q8K215)	46	1
Lysosomal alpha-glucosidase precursor	(P70699)	63	1
Lysosomal protective protein precursor	(P16675)	106	3
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor	(P14562)	96	1
Lysyl-tRNA synthetase	(Q8ZHK5)	216	6
Macrophage capping protein	(P24452)	419	8
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	(P34884)	72	2
Major vault protein (MVP)	(Q62667)	907	18
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	(P14152)	579	12
Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	(P04636)	950	15
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	(O88941)	343	6
Methionyl-tRNA synthetase	(P00959)	331	6
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	(Q02253)	244	5
Microsomal signal peptidase 18 kDa subunit	(P67810)	78	2
Microtubule-associated protein RP/EB family member	(Q3ZBD9)	58	1
Mitochondria fission 1 protein (Fis1 homolog)	(Q9Y3D6)	143	3
Mitochondrial 28S ribosomal protein S28 (S28mt)	(Q9CY16)	110	2
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	(P97700)	135	3
Mitochondrial 39S ribosomal protein L49 (L49mt)	(Q9CQ40)	108	2
Mitochondrial glutamate carrier 1 (GC-1)	(Q9H936)	46	2
Mitochondrial import inner membrane translocase	(Q6GPY0)	87	1
Mitochondrial import inner membrane translocase	(P62077)	82	2
Mitochondrial import receptor subunit TOM70	(Q75Q39)	77	2
Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	(Q16891)	98	1
Mitochondrial ribosomal protein S23 (S23mt)	(Q8VE22)	69	1
Mitochondrial-processing peptidase alpha subunit	(Q10713)	150	2
Mitogen-activated protein kinase 1	(P46196)	65	2
Mitogen-activated protein-binding protein-interact	(Q3T132)	95	2
MMP37-like protein, mitochondrial precursor	(Q3TUH1)	104	3
MMS19-like protein (hMMS19) (MET18 homolog)	(Q96T76)	54	1
Moesin (Membrane-organizing extension spike protein	(P26038)	1313	28
Multifunctional protein ADE2	(P38024)	160	3
Multisynthetase complex auxiliary component p38	(Q9WVM7)	54	1
Multisynthetase complex auxiliary component p43	(Q12904)	142	3
Myb-binding protein 1A (PAR-interacting protein)	(O35821)	356	8
Myoferlin (Fer-1-like protein 3)	(Q9NZM1)	85	2
Myosin Ib (Myosin I alpha) (MMI-alpha) (MMIa)	(P46735)	707	15
Myosin Ic (Myosin I beta) (MMIb)	(Q9WTI7)	1019	18
Myosin Id	(Q5SYD0)	106	2
Myosin light polypeptide 6	(P60661)	345	6
Myosin regulatory light chain 2-A	(P13832)	175	3
Myosin-14 (Myosin heavy chain, nonmuscle IIc)	(Q6URW6)	804	10
Myosin-9 (Myosin heavy chain, nonmuscle IIa)	(Q62812)	2508	51
Myotrophin (V-1 protein)	(P62774)	117	2
N-acetylglucosamine kinase	(Q9UJ70)	222	4
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex	(Q62425)	146	4
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex	(Q9DC69)	234	5
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protei	(Q9DC70)	88	1
NADH-cytochrome b5 reductase ((P20070)	149	3

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
NADP-dependent leukotriene B4 12-hydroxydehydrogen	(P97584)	54	1
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	(P70670)	195	3
Nck-associated protein 1 (NAP 1) (p125Nap1)	(P28660)	402	8
NEDD8 precursor (Ubiquitin-like protein Nedd8)	(P61282)	77	2
NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	(P61081)	92	3
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	(Q09666)	533	11
Neutral alpha-glucosidase AB precursor	(Q8BHN3)	431	9
NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	(Q9CWS0)	480	8
NHP2-like protein 1	(P55769)	88	2
Niban-like protein	(Q8R1F1)	224	4
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	(Q80Z29)	101	3
Nitrilase homolog 1	(Q7TQ94)	83	1
NMDA receptor-regulated protein 1	(Q9BXJ9)	49	1
Nonspecific lipid-transfer protein	(P22307)	291	7
Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	(Q810Q5)	55	1
Nuclear pore complex protein Nup107	(P52590)	119	3
Nuclear pore complex protein Nup155	(O75694)	57	1
Nuclear pore complex protein Nup205	(Q92621)	167	4
Nuclear pore membrane glycoprotein 210 precursor	(P11654)	87	2
Nuclear RNA export factor 1 (Tip-associating protein)	(Q9UBU9)	149	3
Nucleobindin-1 precursor (CALNUC)	(Q02819)	201	4
Nucleolin (Protein C23)	(P13383)	528	10
Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23)	(Q61937)	205	3
Nucleoprotein TPR	(P12270)	58	1
Nucleoside diphosphate kinase (NDK)	(P08879)	153	1
Nucleoside diphosphate kinase B	(P22392)	217	6
Nucleotide-binding protein-like	(Q8TB37)	77	1
ORM1-like protein 1	(Q8JFB7)	54	1
Osteoclast-stimulating factor 1	(Q92882)	79	1
Outer capsid protein VP2	(Q00273)	56	1
Oxidoreductase HTATIP2	(Q9Z2G9)	60	1
Oxysterol-binding protein-related protein 9	(Q96SU4)	56	1
Parathymosin	(P08814)	114	2
Paxillin	(P49024)	50	1
PCTP-like protein (PCTP-L)	(Q9Y365)	110	2
PDZ and LIM domain protein 5 (Enigma homolog)	(Q62920)	132	3
Peflin	(Q641Z8)	53	1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	(P10111)	658	12
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	(P24368)	403	7
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	(Q5B4E7)	103	2
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	(Q26516)	65	1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	(O43447)	78	2
Periplakin	(Q9R269)	2050	43
Peroxiredoxin-1	(Q63716)	535	11
Peroxiredoxin-2	(Q61171)	388	7
Peroxiredoxin-4	(Q9BG12)	91	2
Peroxiredoxin-5, mitochondrial precursor	(Q9R063)	763	14
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3	(Q63448)	137	3
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	(P97852)	53	1
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	(Q9WVK3)	300	4
Peroxisome assembly factor 2 (PAF-2)	(Q13608)	307	6
PHD finger-like domain-containing protein 5A	(Q7RTV0)	86	2
Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	(Q9Y285)	81	1
Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor	(Q8VEM8)	432	8
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	(P31044)	479	7
Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	(P53810)	255	6
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	(Q8BH04)	135	2
Phosphoglucosmutase-1	(Q9D0F9)	91	2

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Phosphoglucomutase-2	(Q7TSV4)	83	2
Phosphoglycerate kinase 1	(P50310)	593	12
Phosphoglycerate mutase 1 4	(P18669)	683	12
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	(Q9N2J2)	74	1
Phosphomannomutase 2	(Q3SZJ9)	73	1
Phosphoserine aminotransferase	(Q99K85)	414	8
Phosphotriesterase-related protein	(Q60866)	53	1
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	(Q8NC51)	212	3
Plastin-1 (I-plastin) (Intestine-specific plastin)	(Q14651)	252	3
Plastin-3 (T-plastin)	(O88818)	756	14
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	(O35264)	48	1
Poly [ADP-ribose] polymerase 3	(Q9Y6F1)	98	2
Poly(rC)-binding protein 1	(Q5E9A3)	276	5
Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein	(P61286)	345	8
Polyadenylate-binding protein 1-A	(P20965)	79	1
Polymerase delta-interacting protein 2	(Q9Y2S7)	165	3
Polymerase I and transcript release factor	(O54724)	471	8
Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB)	(P17225)	154	3
Porphobilinogen deaminase (EC 2.5.1.61) (PBG)	(Q59293)	62	1
PRA1 family protein 3 (ARL-6-interacting protein 5	(Q9ES40)	197	5
Prefoldin subunit 2	(Q9UHV9)	62	1
Prefoldin subunit 5 (C-myc-binding protein Mm-1)	(Q99471)	65	1
Pre-mRNA branch site protein p14	(Q9Y3B4)	103	2
Pre-mRNA-processing factor 6 homolog	(Q91YR7)	77	1
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	(Q6P2Q9)	436	10
Pre-mRNA-splicing factor 19 (PRP19/PSO4 homolog)	(Q5ZMA2)	231	5
Prenylcysteine oxidase precursor	(Q9CQF9)	58	1
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	(P17844)	74	1
Probable deoxycytidine triphosphate deaminase	(Q9YFA8)	224	4
Probable histone-binding protein Caf1	(Q24572)	89	1
Probable kinetochore protein nuf-2	(Q7S9H0)	49	1
Probable protease htpX homolog 1	(Q9RKN3)	46	1
Probable pyruvate dehydrogenase E1 component alpha	(P52899)	151	2
Probable translation initiation factor IF-2	(O29490)	86	1
Probable vacuolar ATP synthase subunit B	(Q19626)	71	1
Probable vacuolar ATP synthase subunit H ((Q84ZC0)	292	7
Profilin-1 (Profilin I)	(P62962)	543	8
Profilin-2 (Profilin II) (Fragment)	(Q09430)	125	2
Programmed cell death 6-interacting protein	(Q8WUM4)	572	11
Programmed cell death protein 5 (TFAR19 protein)	(P56812)	214	3
Programmed cell death protein 6 (Probable calcium	(P12815)	297	5
Programmed cell death protein 8	(Q9JM53)	719	13
Prohibitin	(Q3T165)	549	11
Prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein B	(Q99623)	577	12
Prolactin-inducible protein precursor	(P12273)	108	2
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	(P57761)	343	7
Prolyl endopeptidase	(Q9QUR6)	142	3
Prolyl-tRNA synthetase	(P16659)	1667	22
Propionyl-CoA carboxylase beta chain	(P07633)	106	2
Prostaglandin E synthase 2	(Q8BWM0)	94	1
Prostaglandin E synthase 3	(Q15185)	92	2
Prostaglandin F2 receptor negative regulator precursor	(Q9P2B2)	67	1
Proteasome activator complex subunit 1	(P97371)	308	6
Proteasome activator complex subunit 2	(Q63798)	238	4
Proteasome activator complex subunit 3	(Q5F3J5)	173	3
Proteasome subunit alpha type 1	(O42265)	406	9
Proteasome subunit alpha type 3	(Q58DU5)	409	7
Proteasome subunit alpha type 4	(P25789)	294	6

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Proteasome subunit beta type 2	(P49721)	93	2
Proteasome subunit beta type 5 precursor	(P28074)	143	3
Proteasome subunit beta type 6 precursor	(P28073)	135	3
Proteasome subunit beta type 7 precursor	(Q9JHW0)	111	3
Proteasome subunit beta type 9 precursor	(O35521)	76	1
Protein arginine N-methyltransferase 1	(Q99873)	53	1
Protein arginine N-methyltransferase 5	(O14744)	98	2
Protein diaphanous homolog 1	(O08808)	220	4
Protein disulfide-isomerase A3 precursor	(P11598)	1354	25
Protein disulfide-isomerase A4 precursor	(P38659)	1015	17
Protein disulfide-isomerase A6 precursor	(Q922R8)	417	4
Protein disulfide-isomerase precursor	(Q8R4U2)	1340	27
Protein DJ-1 (Oncogene DJ1)	(Q99497)	80	2
Protein FAM40A	(Q8C079)	46	1
Protein flightless-1 homolog	(Q13045)	101	1
Protein KIAA0196	(Q12768)	260	7
Protein KIAA1967 (Deleted in breast cancer gene 1	(Q8N163)	613	12
Protein kinase C and casein kinase substrate	(Q9UNF0)	138	3
Protein mago nashi homolog 1-related	(Q9CQL1)	89	1
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	(Q5HZV9)	84	1
Protein RCC2 (Telophase disk protein of 60 kDa)	(Q9P258)	50	2
Protein S100-A10 (S100 calcium-binding protein A10	(P05943)	122	2
Protein S100-A11 (S100 calcium-binding protein A11	(Q6B345)	200	3
Protein S100-A4 (S100 calcium-binding protein A4)	(P05942)	284	6
Protein S100-A6 (S100 calcium-binding protein A6)	(P05964)	459	8
Protein S100-A7 (S100 calcium-binding protein A7)	(P31151)	53	1
Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2	(Q01105)	153	3
Protein transport protein Sec61 beta subunit	(P60467)	86	2
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	(P21981)	67	1
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	(P23606)	893	15
Protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1	(P0C089)	73	2
Proteolipid protein 2	(Q9R1Q7)	55	1
Prothymosin alpha [Contains: Thymosin alpha]	(P06302)	189	3
Proto-oncogene C-crk (P38)	(Q04929)	73	1
Purine nucleoside phosphorylase	(P00491)	258	4
Puromycin-sensitive aminopeptidase ((P55786)	798	14
Putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	(O88696)	92	3
Putative C10 protein	(Q99622)	52	1
Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17	(P84733)	65	1
Putative eukaryotic translation initiation factor	(O75642)	134	2
Putative helicase MOV-10	(P23249)	48	1
Putative mitochondrial import inner membrane transporter	(Q4FZG7)	68	1
Putative nicotinamide N-methyltransferase	(Q9UT28)	46	1
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent	(O43143)	148	3
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1	(Q922W5)	111	2
Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	(Q922Q4)	95	2
Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor	(P52873)	955	18
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	(P11177)	528	10
Pyruvate kinase isozyme M1	(P11979)	1675	29
Pyruvate kinase isozyme R (EC 2.7.1.40) (Fragment)	(Q29536)	154	1
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	(P50396)	258	6
Rab GDP dissociation inhibitor beta	(P50399)	114	2
Ran GTPase-activating protein 1	(P46061)	420	6
Ran-binding protein 2 (RanBP2)	(Q9ERU9)	347	6
Ran-specific GTPase-activating protein	(P34022)	208	4
Ras association domain-containing protein 2	(Q3B7D5)	45	1
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	(Q9JKF1)	2740	53
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	(Q13576)	644	10

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	(P62998)	156	5
Ras-related protein Rab-10	(P24409)	167	2
Ras-related protein Rab-1A	(P62822)	176	3
Ras-related protein Rab-2A	(P61105)	545	8
Ras-related protein Rab-7	(Q3T0F5)	268	4
Ras-related protein Rap-1A precursor	(P62833)	325	6
Ras-related protein RIC2	(P40393)	103	2
Receptor expression-enhancing protein 5	(Q5RE33)	90	2
Receptor expression-enhancing protein 6	(Q5XI60)	65	1
Reticulon-3 (Neuroendocrine-specific protein-like)	(Q95197)	58	2
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase precursor	(Q920A6)	70	1
Retrograde regulation protein 2	(P32608)	48	2
Rho-associated protein kinase 1	(P70335)	188	3
Rho-associated protein kinase 2	(Q28021)	610	13
Rho-GTPase-activating protein 5 (p190-B)	(Q13017)	71	1
Ribonuclease inhibitor	(P29315)	203	3
Ribonuclease UK114	(P52759)	120	3
Ribosomal protein L22-like 1	(Q6P5R6)	62	1
RNA 3'-terminal phosphate cyclase	(O00442)	221	3
RNA-binding protein 8A (RNA-binding motif protein)	(Q9Y5S9)	51	1
RuvB-like 1	(Q9Y265)	284	5
RuvB-like 2	(Q9Y230)	179	3
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase	(O46674)	249	4
Scavenger mRNA decapping enzyme DcpS	(Q9DAR7)	54	1
SEC13-related protein (SEC13-like protein 1)	(P55735)	55	1
Selenium-binding protein 1	(Q8VIF7)	110	2
Septin-2 (Protein NEDD5)	(Q15019)	216	3
Septin-6	(Q9R1T4)	63	2
Septin-9 (MLL septin-like fusion protein)	(Q9UHD8)	110	3
Serine beta-lactamase-like protein LACTB	(Q9EP89)	46	1
Serine hydroxymethyltransferase	(P34897)	260	5
Serine hydroxymethyltransferase	(P50432)	239	3
Serine palmitoyltransferase 2	(O15270)	69	1
Serine protease HTRA2, mitochondrial precursor	(Q9JIY5)	105	2
Serine/threonine-protein kinase 24	(Q99KH8)	81	2
Serine/threonine-protein kinase D1	(Q9WTQ1)	69	2
Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	(Q7TT49)	237	4
Serine/threonine-protein kinase PAK 2	(Q64303)	158	3
Serine/threonine-protein phosphatase 2A	(P30153)	561	11
Serine/threonine-protein phosphatase 2A	(P62714)	155	3
Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory	(P58389)	203	4
Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic s	(P60510)	75	2
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha	(Q3T0E7)	253	4
Serine/threonine-protein phosphatase rdgC	(P40421)	46	1
Serine-threonine kinase receptor-associated protein	(Q9Y3F4)	97	3
Serologically defined colon cancer antigen 1	(O60524)	91	2
Serpin B5 precursor (Maspin)	(P70564)	146	2
Serpin B6 (Placental thrombin inhibitor)	(Q60854)	128	2
Serum albumin precursor	(P02768)	866	14
Serum paraoxonase/arylesterase 2	(Q6AXM8)	53	1
Serum paraoxonase/lactonase 3	(Q68FP2)	209	3
Seryl-tRNA synthetase	(P0A8L1)	51	1
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	(O75368)	47	1
Short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	(Q9WVK7)	145	3
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	(P15651)	219	5
Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein homolog	(Q3SWZ6)	225	4
Sideroflexin-3	(Q9JHY2)	81	1
Signal recognition particle 14 kDa protein (SRP14)	(P16255)	245	3

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Signal recognition particle 54 kDa protein 2 (SRP5	(P49972)	130	2
Signal recognition particle 68 kDa protein	(Q8BMA6)	72	1
Signal transducer and activator of transcription 1	(P42225)	46	1
Signal transducer and activator of transcription 3	(P61635)	84	2
Single-stranded DNA-binding protein (SSB)	(P0AGE0)	170	2
Small nuclear ribonucleoprotein E (snRNP-E)	(Q7ZUG0)	47	1
Small nuclear ribonucleoprotein G (snRNP-G)	(P62308)	173	3
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	(P62314)	93	3
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	(P62316)	86	2
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	(P62318)	120	2
Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B	(P17136)	47	1
Small ubiquitin-related modifier 1 precursor (SUMO-1)	(Q5E9D1)	147	3
Small ubiquitin-related modifier 2 precursor (SUMO-2)	(P61955)	82	2
S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	(Q9CQ65)	275	5
Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain	(P50997)	88	3
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta	(P14094)	64	1
Sorcin (22 kDa protein) (CP-22) (V19)	(P05044)	276	6
Sorting nexin-12	(Q9UMY4)	76	2
Sorting nexin-2	(O60749)	291	7
Sorting nexin-3	(Q1RMH8)	79	2
Sorting nexin-6 (TRAF4-associated factor 2)	(Q9UNH7)	161	3
Spectrin alpha chain, brain	(P16086)	1549	26
Spectrin beta chain, brain 1	(Q62261)	779	14
Spermidine synthase	(Q64674)	90	2
S-phase kinase-associated protein 1A	(P63209)	150	3
Sphingosine kinase 2	(Q9NRA0)	53	1
Spliceosome RNA helicase BAT1	(Q5WR10)	195	1
Splicing factor 3A subunit 3	(Q9D554)	123	2
Splicing factor 3B subunit 1	(O75533)	128	2
Splicing factor 3B subunit 3	(Q15393)	220	5
Splicing factor, arginine/serine-rich 2	(Q3MHR5)	54	1
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	(P23246)	93	1
SPRY domain-containing protein 4	(Q91WK1)	177	3
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-ce	(Q15020)	189	4
Staphylococcal nuclease domain-containing protein	(Q66X93)	795	16
STE20-like serine/threonine-protein kinase	(O08815)	218	4
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase	(Q9R1J0)	134	3
Stomatin-like protein 2 (SLP-2)	(Q99JB2)	60	1
Stress-70 protein, mitochondrial precursor	(P48721)	1980	33
Stress-induced-phosphoprotein 1 (ST11) (Hsc70/Hsp9)	(O54981)	394	7
Striatin-3	(P58405)	65	1
Structural maintenance of chromosome 1 protein	(O93308)	55	1
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] beta-chain	(Q9P2R7)	228	4
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] alpha-chain	(Q9WUM5)	290	5
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	(Q9Z2I8)	485	7
Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1	(Q9D0K2)	121	3
Sulfate transporter 2.2 (AST56) (ATH14)	(P92946)	58	1
Sulfated glycoprotein 1 precursor (SGP-1)	(P10960)	103	2
Sulfide:quinone oxidoreductase	(Q9R112)	1296	21
Sulfotransferase 1A1	(P17988)	330	6
Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	(P52847)	450	9
Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1	(Q29YR5)	70	1
SUMO-1-conjugating enzyme UBC9	(P63283)	105	3
Superkiller viralicidic activity 2-like 2	(P42285)	232	5
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	(P07632)	409	7
SWI/SNF complex subunit SMARCC2	(Q6PDG5)	75	1
Synembryn-A (Protein Ric-8A)	(Q3TIR3)	79	1
Syntaxin-3	(Q64704)	70	1

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Talin-1	(Q9Y490)	1089	21
TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)	(Q13148)	78	1
TBC1 domain family member 1	(Q60949)	47	1
TBC1 domain family member 15	(Q9CXF4)	62	1
T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha)	(P18279)	794	15
T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta)	(P80314)	916	15
T-complex protein 1 subunit delta (TCP-1-delta)	(Q2T9X2)	567	11
T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon)	(Q5RF02)	433	9
T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta)	(Q2NKZ1)	668	11
T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma)	(Q3T0K2)	424	9
T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta)	(P42932)	615	10
T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta)	(Q3MHL7)	803	15
Tetratricopeptide repeat protein KIAA0372	(Q6PGP7)	72	1
Thiamine-monophosphate kinase	(P0AGG0)	314	5
Thioredoxin	(P11232)	310	7
Thioredoxin domain-containing protein 12 precursor	(Q5E936)	107	2
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	(O89049)	248	4
Thioredoxin-dependent peroxide reductase	(P35705)	54	2
Thioredoxin-like protein 1	(O43396)	331	6
Thioredoxin-like protein 2	(Q9CQM9)	302	8
Thioredoxin-like protein 5	(Q9CQM5)	68	2
Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic ((Q5XHY5)	48	1
TraB domain-containing protein	(Q9H4I3)	60	1
Trafficking protein particle complex subunit 1	(Q5NCF2)	51	1
Transaldolase	(Q9EQS0)	946	19
Transcription elongation factor B polypeptide 1	(Q2KII4)	141	3
Transcription elongation factor B polypeptide 2	(Q15370)	273	5
Transcription factor BTF3	(P20290)	87	2
Transcription factor BTF3 homolog 4	(Q96K17)	53	1
Transcription intermediary factor 1-beta	(Q13263)	280	6
Transferrin receptor protein 1 (TfR1)	(Q99376)	154	3
Transgelin-2 (SM22-alpha homolog)	(P37802)	635	10
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	(P55072)	1121	21
Transketolase	(P50137)	1584	28
Transmembrane emp24 domain trafficking protein 2 p	(P49020)	176	3
Transmembrane protein 106B	(Q6AYA5)	52	1
Transmembrane protein 109 precursor	(Q6AYQ4)	204	4
Transmembrane protein Tmp21 precursor	(O35587)	482	8
Transportin-1 (Importin beta-2)	(Q92973)	300	5
Transportin-3 (Transportin-SR) (TRN-SR)	(Q9Y5L0)	137	3
Tricarboxylate transport protein	(P79110)	62	1
Trifunctional enzyme alpha subunit	(Q64428)	1291	19
Trifunctional enzyme beta subunit	(Q60587)	124	3
Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial precursor	(Q9NVH6)	47	1
Triosephosphate isomerase	(P48500)	156	4
Tripeptidyl-peptidase 2	(Q9V6K1)	230	5
TRM112-like protein	(Q9DCG9)	52	2
tRNA-nucleotidyltransferase 1, mitochondrial precursor	(Q8K1J6)	178	3
Tropomyosin alpha-3 chain (Tropomyosin-3)	(P06753)	614	4
Tropomyosin alpha-4 chain (Tropomyosin-4) (TM-4)	(P09495)	987	21
Tropomyosin beta chain (Tropomyosin 2)	(P07951)	71	1
Tryptophanyl-tRNA synthetase	(Q8Y0A1)	277	4
Tubulin alpha chain (Fragment)	(P33628)	1013	1
Tubulin alpha-1 chain (Alpha-tubulin 1)	(P81948)	983	1
Tubulin alpha-3 chain (Alpha-III tubulin)	(Q94572)	98	1
Tubulin alpha-6 chain (Alpha-tubulin 6)	(Q6AYZ1)	1224	19
Tubulin alpha-8 chain	(P52274)	70	1
Tubulin alpha-ubiquitous chain	(P68363)	1173	1

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Tubulin beta chain (Beta tubulin)	(P79008)	1457	22
Tubulin beta-1 chain (Beta-tubulin isotype I)	(P69893)	1360	4
Tubulin beta-2C chain	(Q3MHM5)	1408	2
Tubulin beta-4 chain	(Q3ZBU7)	1404	1
Tubulin beta-6 chain	(Q9BUF5)	1238	6
Tubulin-specific chaperone A	(P48427)	129	3
Tubulin-specific chaperone B	(Q9D1E6)	67	2
Tumor protein D54 (hD54)	(O43399)	64	1
Twinfilin-1	(Q5RJR2)	52	2
-type proton ATPase subunit C 1	(Q5FVI6)	54	1
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	(Q90687)	124	3
Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(P54577)	748	15
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3	(Q32PE9)	75	2
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4	(Q9QXA5)	129	3
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6	(P62312)	109	3
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM8	(Q3ZCE0)	167	3
Ubiquitin	(P62990)	396	8
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 19	(O94966)	64	1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	(P45974)	662	11
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	(Q9XSJ0)	75	1
Ubiquitin conjugation factor E4 A	(Q6P7A2)	76	1
Ubiquitin thioesterase protein OTUB1	(Q96FW1)	267	5
Ubiquitin-activating enzyme E1 1	(Q02053)	794	13
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	(P61077)	206	4
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H	(Q32LN1)	54	1
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	(P68036)	421	8
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	(Q9EQX9)	212	5
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	(Q9D2M8)	252	5
Ubiquitin-fold modifier 1 precursor	(Q803Y4)	90	2
Ubiquitin-like 1-activating enzyme E1A	(Q9R1T2)	61	1
Ubiquitin-like 1-activating enzyme E1B	(Q9Z1F9)	431	8
Ubiquitin-like protein 4A	(P21126)	61	2
UDP-glucose 6-dehydrogenase	(P12378)	120	2
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	(Q9JLA3)	50	1
UDP-glucuronosyltransferase 1-1 precursor	(Q63886)	460	3
UDP-glucuronosyltransferase 1-6 precursor	(P08430)	357	1
UDP-glucuronosyltransferase 1-7 precursor	(Q64633)	591	11
UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosamide	(O15294)	88	2
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	(Q16222)	49	1
UMP-CMP kinase	(P30085)	88	2
UNC45 homolog A (UNC-45A)	(Q99KD5)	122	3
Uncharacterized protein C11orf2	(Q9UID3)	48	1
Uncharacterized protein C19orf10 homolog precursor	(Q9CPT4)	65	2
Uncharacterized protein C6orf150	(Q8N884)	50	1
UPF0103 protein C2orf4 (C21orf19-like protein)	(Q9Y316)	58	2
UPF0363 protein C7orf20 homolog	(Q9D1H7)	71	1
UPF0385 protein C1orf82 homolog	(Q5I0E6)	49	2
Up-regulated during skeletal muscle growth protein	(Q9JJW3)	168	3
Uridine 5'-monophosphate synthase (UMP synthase)	(P13439)	235	5
Uroporphyrinogen decarboxylase	(P32362)	166	3
UV excision repair protein RAD23 homolog B	(Q29RK4)	51	1
Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	(Q29048)	671	11
Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	(P62814)	372	8
Vacuolar ATP synthase subunit D	(P39942)	137	2
Vacuolar ATP synthase subunit E	(P11019)	178	3
Vacuolar ATP synthase subunit F	(Q28029)	52	1
Vacuolar protein sorting 26A-A	(Q6IRD0)	124	4
Vacuolar protein sorting 29	(Q9UBQ0)	158	3

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Vacuolar protein sorting protein 25 (hVps25)	(Q9BRG1)	52	1
Vacuolar protein sorting protein 53	(Q5VIR6)	58	2
Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subunit	(O97681)	49	1
Valyl-tRNA synthetase	(Q97ZK9)	652	14
Very-long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	(P48818)	234	4
Vesicle transport protein GOT1B	(Q2YDE3)	70	1
Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP-8)	(O70404)	193	4
Vesicle-associated membrane protein-associated protein	(Q9WV55)	323	7
Vesicular integral-membrane protein VIP36 precursor	(Q9DBH5)	63	2
Vigilin	(P81021)	114	2
Villin-1	(Q62468)	195	3
Vinculin (Metavinculin)	(P18206)	1306	27
Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like	(Q8N0U8)	55	1
Voltage-dependent anion-selective channel protein	(Q60932)	353	5
Voltage-dependent anion-selective channel protein	(P68002)	133	1
WD repeat protein 23	(Q5E9I8)	123	3
WD repeat protein 61	(Q32LN7)	172	2
WD-repeat protein 1 (Actin-interacting protein 1)	(O88342)	402	9
Xaa-Pro aminopeptidase 1	(Q9NQW7)	310	6
Xanthine dehydrogenase/oxidase	(P22985)	528	10
Y-box-binding protein 2-A	(P21574)	156	2
Zinc finger CDGSH domain-containing protein 1	(Q91WS0)	87	2
Zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein	(Q8VDQ1)	149	3

8.3 Durch die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Affinitätsreinigung C gebundene Proteine

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	(Q15029)	74	2
26S protease regulatory subunit 4 (P26s4)	(Q90732)	105	2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	(Q99460)	368	7
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	(O00232)	51	1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	(Q9LT08)	60	1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	(Q8VDM4)	166	2
30S ribosomal protein S12	(Q92QH4)	137	3
30S ribosomal protein S2	(P0A7V2)	62	2
30S ribosomal protein S21	(P68681)	177	3
30S ribosomal protein S3	(P47403)	248	5
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	(P13437)	131	3
40S ribosomal protein S11	(P62280)	62	2
40S ribosomal protein S13	(Q56JX8)	315	6
40S ribosomal protein S14	(P48150)	83	2
40S ribosomal protein S15a	(P62244)	181	4
40S ribosomal protein S16	(P62249)	247	5
40S ribosomal protein S17	(P63273)	164	4
40S ribosomal protein S18	(Q3T0R1)	237	5
40S ribosomal protein S19	(P39019)	279	6
40S ribosomal protein S20	(P60866)	210	3
40S ribosomal protein S23	(P62298)	132	3
40S ribosomal protein S24	(Q56JU9)	136	2
40S ribosomal protein S25	(Q56JX5)	289	5

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
40S ribosomal protein S26	(P30742)	113	2
40S ribosomal protein S27-like protein	(Q3T0B7)	84	2
40S ribosomal protein S28	(Q6PBK3)	245	5
40S ribosomal protein S3a (EtS3a)	(O43999)	168	4
40S ribosomal protein SA (p40) (C10 protein)	(P26452)	283	5
50S ribosomal protein L5	(P62401)	519	9
50S ribosomal protein L6	(P0AG57)	52	1
60S acidic ribosomal protein P0 (L10E) (Fragment)	(Q95140)	195	3
60S acidic ribosomal protein P1	(P18660)	57	1
60S acidic ribosomal protein P2	(P02401)	336	5
60S ribosomal protein L10-A (QM protein homolog)	(Q09127)	48	1
60S ribosomal protein L12	(P23358)	252	5
60S ribosomal protein L22	(P35268)	158	3
60S ribosomal protein L23 (Ribosomal protein L17)	(P62829)	329	7
60S ribosomal protein L26-like 1	(Q9UNX3)	84	1
60S ribosomal protein L27	(P61356)	190	4
60S ribosomal protein L27a	(P18445)	68	1
60S ribosomal protein L30	(P58372)	164	3
60S ribosomal protein L31	(P62899)	87	2
60S ribosomal protein L34	(Q7ZWJ7)	59	1
60S ribosomal protein L38	(P63173)	242	5
60S ribosomal protein L40 (CEP52)	(P63048)	47	1
60S ribosomal protein L5-A	(P15125)	149	2
78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor	(P36604)	1971	33
Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	(P62739)	156	2
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	(P60712)	1344	24
Actin-like protein 3 (Actin-related protein 3)	(P61157)	52	1
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	(O15145)	143	3
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	(P59998)	154	4
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	(O15511)	169	2
Acyl-coenzyme A thioesterase 8	(O14734)	64	1
ADP-ribosylation factor	(P34728)	58	1
ADP-ribosylation factor 4	(P61750)	227	5
ADP-ribosylation factor 6	(P26990)	166	2
AFG3-like protein 2	(Q8JZQ2)	57	1
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	(P81178)	48	1
Alpha-actinin-1 (Alpha-actinin cytoskeletal isoform)	(Q9Z1P2)	1034	8
Alpha-actinin-4 (Non-muscle alpha-actinin 4)	(P57780)	1879	35
Alpha-mannosidase 2C1	(P21139)	78	1
Alpha-S1-casein precursor	(P02662)	82	2
Alpha-S2-casein precursor	(P02663)	57	2
Annexin A1 (Annexin I) (Lipocortin I) (Calpactin I)	(P10107)	519	7
Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II) (Calpactin II)	(Q07936)	2929	53
Annexin A4 (Annexin IV) (Lipocortin IV)	(P55260)	68	1
Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(P37880)	333	7
Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q3SYZ4)	128	2
ATP synthase beta chain 1, mitochondrial precursor	(P83483)	126	2
ATP synthase epsilon chain, mitochondrial	(P05632)	79	2
ATP synthase subunit alpha	(Q89X72)	1021	19
ATPase family AAA domain-containing protein 3	(Q92511)	565	11
ATPase family AAA domain-containing protein 3A	(Q9NVI7)	261	1
ATP-binding cassette sub-family B member 7,	(Q61102)	61	1
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	(P32807)	81	1
ATP-dependent RNA helicase DDX1	(Q92499)	65	1
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	(O00571)	115	2
Beta-casein precursor	(P02666)	72	2
Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	(Q8CGC7)	299	5
CAD protein	(Q91437)	363	5

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aral	(O75746)	146	2
Carbonyl reductase [NADPH] 1	(P47727)	1213	21
Carnitine O-palmitoyltransferase I, liver isoform	(P97742)	431	8
Caspase-14 precursor	(P31944)	67	1
Cathepsin D precursor	(P24268)	52	1
CD59 glycoprotein precursor	(P27274)	71	1
Cingulin	(P59242)	48	2
Clathrin heavy chain	(Q68FD5)	2165	41
Claudin-1	(P56745)	101	1
Claudin-3	(Q9Z0G9)	282	5
Claudin-4	(Q6BBL6)	93	1
Claudin-7	(Q9Z1L1)	104	2
Coatomer subunit alpha (Alpha-coat protein)	(Q27954)	1354	25
Coatomer subunit beta' (Beta'-coat protein)	(P35605)	1188	23
Coatomer subunit beta (Beta-coat protein)	(P53618)	155	3
Coatomer subunit delta (Delta-coat protein)	(P53619)	122	2
Coatomer subunit epsilon (Epsilon-coat protein)	(O89079)	184	4
Coatomer subunit gamma (Gamma-coat protein)	(P53620)	70	1
Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform)	(P18760)	150	1
Cofilin-2 (Cofilin, muscle isoform)	(Q9Y281)	164	3
Copine-2 (Copine II)	(Q96FN4)	61	1
Coronin-2A	(Q8C0P5)	64	1
CTP synthase 1-A	(Q5XHA8)	60	1
Cullin-1 (CUL-1)	(Q13616)	69	1
Cullin-4A (CUL-4A)	(Q3TCH7)	61	1
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	(Q86VP6)	258	4
Cysteinyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q9ER72)	682	13
Cytochrome c oxidase polypeptide VIIa-liver/heart	(P35171)	77	1
Cytoplasmic linker protein 2	(Q9UDT6)	69	1
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	(P29147)	115	2
Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS)	(P54886)	87	1
Desmoplakin (DP)	(P15924)	75	1
Destrin (Actin-depolymerizing factor) (ADF)	(Q9R0P5)	334	6
DNA damage-binding protein 1	(P33194)	1913	40
DNA-directed RNA polymerase I largest subunit	(O95602)	105	2
DNA-directed RNA polymerase II 14.5 kDa polypeptide	(P36954)	158	2
DNA-directed RNA polymerase II 16 kDa polypeptide	(O15514)	334	6
DNA-directed RNA polymerase II 33 kDa polypeptide	(P97760)	470	7
DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide	(Q6QN04)	129	2
DNA-directed RNA polymerase II largest subunit	(P24928)	2709	52
DNA-directed RNA polymerase II polypeptide 2	(Q753Q4)	1911	33
DNA-directed RNA polymerase II subunit J	(P52435)	200	5
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 14.4 k	(P61217)	233	7
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 17.1 k	(P52434)	217	4
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 7.0 kD	(P53803)	52	1
DnaJ homolog subfamily A member 3	(Q99M87)	90	2
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein	(P07153)	58	1
Dynactin-1 (150 kDa dynein-associated polypeptide)	(P28023)	303	5
Dynein heavy chain, cytosolic (DYHC)	(P38650)	4133	81
Dynein light chain 1, cytoplasmic	(P61285)	196	4
ECT2 protein	(Q07139)	66	1
ELAV-like protein 1 (Hu-antigen R) (HuR)	(Q15717)	72	1
Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	(P05303)	157	3
Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	(P25698)	1081	20
Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	(Q27139)	61	1
Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	(P68103)	446	9
Elongation factor 1-alpha 2 (EF-1-alpha-2)	(Q32PH8)	244	4
Elongation factor 1-alpha, somatic form	(P13549)	273	5

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	(O70251)	711	13
Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	(Q68FR6)	538	13
Elongation factor 2 (EF-2)	(P05086)	250	6
Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon	(Q9D1M4)	75	1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(O15371)	165	4
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q99613)	262	6
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q8JZQ9)	317	8
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q14152)	159	3
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	(Q9Y262)	128	2
Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin-2)	(P31977)	840	18
Fatty acid synthase	(P12785)	1427	29
Filamin-A (Alpha-filamin) (Filamin-1)	(Q8BTM8)	2060	39
Filamin-B (FLN-B) (Beta-filamin)	(Q80X90)	1439	25
Fumarate and nitrate reduction regulatory protein	(Q9LA24)	126	2
Galectin-4 (Lactose-binding lectin 4)	(P38552)	155	3
Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor)	(P13020)	297	7
Genome polyprotein B (RNA1 polyprotein)	(P35930)	48	1
Glucokinase (EC 2.7.1.2) (Glucose kinase)	(P0A6V8)	184	3
Glutaredoxin-1 (Thioltransferase-1) (TTase-1)	(Q9ESH6)	453	5
Glutathione S-transferase 26 kDa	(P08515)	2072	38
Glutathione S-transferase alpha M14	(P51781)	92	2
Glutathione S-transferase alpha-3	(P04904)	111	2
Glutathione S-transferase Mu 2	(P15626)	609	11
Glutathione S-transferase Mu 5	(P46439)	149	2
Glutathione S-transferase Mu 6	(O35660)	75	1
Glutathione S-transferase P	(P04906)	467	8
Glutathione S-transferase Y1	(Q00285)	181	3
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	(P04797)	200	4
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2	(P63243)	73	2
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O)	(Q9UBI6)	70	2
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	(Q7ZX41)	54	1
Heat shock 70 kDa protein cognate 2	(P11146)	218	1
Heat shock 70-related protein 1	(P12076)	678	1
Heat shock cognate 71 kDa protein	(P19378)	2511	42
Heat shock protein 70 B2	(P41827)	644	11
Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	(P07901)	356	2
Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84)	(Q9GKX8)	437	9
Heat-shock protein 105 kDa	(Q92598)	256	3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 homolog	(P51989)	57	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K)	(P61978)	111	2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L)	(P14866)	285	6
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNP M)	(P52272)	510	9
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q)	(O60506)	167	3
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	(P22626)	277	6
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U)	(Q00839)	170	3
Histone H1t (Testicular H1 histone)	(P22492)	56	1
Histone H2A	(P40281)	86	1
Histone H2A type 1-B	(P04908)	110	2
Histone H2B 1.2 (H2B1.2)	(P06900)	120	2
Histone H2B type 1-B (h2B-143)	(Q64475)	115	2
Homerin	(Q86YZ3)	83	2
Ig alpha-1 chain C region	(P20758)	52	1
Importin beta-1 subunit (Karyopherin beta-1 subunit)	(Q14974)	126	2
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein	(Q5SF07)	98	2
Integrin alpha-3 precursor (Galactoprotein B3)	(P17852)	94	2
Interleukin-1 receptor antagonist protein precursor	(P25086)	92	2
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta	(O77784)	51	2
Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BU30)	296	6

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Kinesin heavy chain	(Q61768)	284	4
Lamin-A/C (70 kDa lamin) (NY-REN-32 antigen)	(P02545)	503	9
Lamin-B1	(P20700)	116	2
LanC-like protein 1	(Q9QX69)	683	13
Lethal(2) giant larvae protein homolog 2	(Q3TJ91)	243	5
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein	(Q66HF9)	73	1
Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(Q8BMJ2)	130	3
Leukocyte elastase inhibitor (LEI) (Serp1 B1)	(P30740)	57	1
Loss of heterozygosity 11 chromosomal region 2 gen	(Q75WE7)	429	7
Low-density lipoprotein receptor precursor	(P35952)	57	1
Lysosomal protective protein precursor	(P16675)	108	4
Lysozyme C precursor	(P79179)	68	2
Lysyl-tRNA synthetase	(Q8ZHK5)	81	3
Macrophage capping protein	(P24452)	77	1
Major vault protein (MVP)	(Q62667)	1123	23
Microsomal glutathione S-transferase 1	(P08011)	65	1
Microtubule-actin cross-linking factor 1	(Q9QXZ0)	255	6
Mitochondrial 39S ribosomal protein L49 (L49mt)	(Q9CQ40)	51	1
Mitochondrial glutamate carrier 1 (GC-1)	(Q9H936)	153	4
Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	(Q16891)	93	2
Mitochondrial Rho GTPase 1 (MIRO-1)	(Q8BG51)	68	1
Mitochondrial-processing peptidase alpha subunit	(Q10713)	51	1
Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	(P26038)	107	4
Multisynthetase complex auxiliary component p38	(Q9WVM7)	51	1
Myoferlin (Fer-1-like protein 3)	(Q9NZM1)	59	1
Myosin Ib (Myosin I alpha) (MMI-alpha) (MMIa)	(P46735)	241	3
Myosin Ic (Myosin I beta) (MMIb)	(Q9WTI7)	66	1
Myosin light polypeptide 6	(P60661)	193	4
Myosin regulatory light chain 2-A	(P13832)	50	1
Myosin-9 (Myosin heavy chain, nonmuscle IIa)	(Q62812)	202	3
Myotrophin (V-1 protein)	(P62774)	151	2
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex	(Q62425)	152	3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex	(Q9DC69)	117	2
Nck-associated protein 1 (NAP 1) (p125Nap1)	(P28660)	109	2
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	(Q09666)	466	10
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	(Q15233)	187	3
Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	(Q810Q5)	143	3
Nuclear pore membrane glycoprotein 210 precursor	(P11654)	80	1
Nuclear RNA export factor 1 (Tip-associating protein)	(Q9UBU9)	60	1
Nucleolar transcription factor 1	(P17480)	47	1
Nucleolin (Protein C23)	(P13383)	121	2
Nucleoprotein TPR	(P12270)	205	4
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	(Q26516)	54	1
Periplakin	(Q9R269)	1625	32
Peroxisome assembly factor 2 (PAF-2)	(Q13608)	60	1
Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	(Q9Y285)	89	1
Plakophilin-3	(Q9Y446)	59	1
Plectin-1 (PLTN) (PCN)	(P30427)	3276	65
Poly [ADP-ribose] polymerase 3	(Q9Y6F1)	47	1
Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein)	(P61286)	162	4
Polyadenylate-binding protein 4 (Poly(A)-binding protein)	(Q13310)	52	1
Polymerase delta-interacting protein 2	(Q9Y2S7)	231	4
Polymerase I and transcript release factor	(O54724)	206	5
Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB)	(P17225)	156	3
Prefoldin subunit 2	(Q9UHV9)	127	2
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	(P17844)	62	1
Probable mitochondrial 39S ribosomal protein L23	(Q5TUE9)	70	1

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Probable vacuolar ATP synthase subunit B	(Q19626)	107	2
Programmed cell death 6-interacting protein	(Q8WUM4)	94	2
Programmed cell death protein 6	(P12815)	49	1
Programmed cell death protein 8	(Q9JM53)	148	3
Prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein B)	(Q99623)	299	4
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	(P57761)	49	1
Prolyl-tRNA synthetase	(P16659)	1948	28
Protein flightless-1 homolog	(Q13045)	66	2
Protein KIAA1967 (Deleted in breast cancer gene 1)	(Q8N163)	98	2
Protein RCC2 (Telophase disk protein of 60 kDa)	(Q9P258)	208	5
Protein S100-A10 (S100 calcium-binding protein A10)	(P05943)	444	9
Protein S100-A11 (S100 calcium-binding protein A11)	(Q6B345)	322	5
Protein S100-A14 (S100 calcium-binding protein A14)	(Q9D2Q8)	51	1
Protein S100-A4 (S100 calcium-binding protein A4)	(P05942)	323	6
Protein S100-A6 (S100 calcium-binding protein A6)	(P05964)	405	7
Protein S100-A7 (S100 calcium-binding protein A7)	(P31151)	121	2
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	(P23606)	2197	40
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RN	(O43143)	58	1
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1	(Q922W5)	84	1
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	(P11177)	236	4
Ran GTPase-activating protein 1	(P46061)	506	8
Ran-binding protein 2 (RanBP2)	(Q9ERU9)	579	12
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	(Q9JKF1)	858	19
Rubber elongation factor protein (REF)	(P15252)	59	2
RuvB-like	(Q9Y265)	386	7
SEC13-related protein (SEC13-like protein 1)	(P55735)	52	1
Serine beta-lactamase-like protein LACTB	(Q9EP89)	61	1
Serine protease HTRA2, mitochondrial precursor	(Q9JIY5)	69	1
Serine/threonine-protein phosphatase 2A	(P30153)	97	2
Serine/threonine-protein phosphatase rdgC	(P40421)	48	1
Serpin B6 (Placental thrombin inhibitor)	(Q60854)	77	2
Serum albumin precursor	(P02768)	187	3
Small nuclear ribonucleoprotein G (snRNP-G)	(P62308)	102	2
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	(P62314)	68	2
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	(P62318)	96	1
Small ubiquitin-related modifier 1 precursor (SUMO-1)	(Q5E9D1)	152	3
Small ubiquitin-related modifier 4 precursor (SUMO-4)	(Q6EEV6)	98	1
Sorcin (22 kDa protein) (CP-22) (V19)	(P05044)	96	3
Spectrin alpha chain, brain	(P16086)	4039	74
Spectrin beta chain, brain 1	(Q62261)	2420	48
Spectrin beta chain, brain 2	(O15020)	186	1
Sphingosine kinase 2	(Q9NRA0)	56	1
Splicing factor 3B subunit 3	(Q15393)	101	1
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	(P23246)	230	5
Src substrate cortactin	(Q60598)	351	7
Staphylococcal nuclease domain-containing protein	(Q66X93)	59	1
Stress-70 protein, mitochondrial precursor	(P48721)	1902	33
Sulfide:quinone oxidoreductase	(Q9R112)	916	15
Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	(P52847)	56	2
SUMO-1-conjugating enzyme UBC9	(P63283)	102	2
Superkiller viralicidic activity 2-like 2	(P42285)	138	3
T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha)	(P18279)	278	5
T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta)	(P80314)	61	1
T-complex protein 1 subunit delta (TCP-1-delta)	(Q2T9X2)	249	4
T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta)	(Q2NKZ1)	74	2
T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma)	(Q3T0K2)	323	6
T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta) (C	(P42932)	145	2
T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta)	(Q3MHL7)	112	2

Protein	Zugangsnummer SwissProt	Score	Peptide
Thimet oligopeptidase	(P24155)	202	4
Thioredoxin	(P11232)	298	6
Thioredoxin-like protein 2	(Q9CQM9)	168	5
Transcription elongation factor B polypeptide 2	(Q15370)	88	2
Transcription intermediary factor 1-beta	(Q13263)	186	4
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	(P55072)	818	15
Trifunctional enzyme alpha subunit	(Q64428)	1501	26
Tripeptidyl-peptidase 2	(Q9V6K1)	49	1
Tubulin alpha-1 chain (Alpha-tubulin 1)	(P81948)	590	4
Tubulin alpha-3 chain (Alpha-III tubulin)	(Q94572)	93	1
Tubulin alpha-6 chain (Alpha-tubulin 6)	(Q6AYZ1)	650	11
Tubulin alpha-ubiquitous chain	(P68363)	124	3
Tubulin beta chain (Beta tubulin)	(P79008)	110	2
Tubulin beta-1 chain (Beta-tubulin isotype I)	(P69893)	1107	5
Tubulin beta-2C chain	(Q3MHM5)	1158	18
Tubulin beta-3 chain	(Q2T9S0)	854	1
Tubulin beta-6 chain	(Q9BUF5)	580	1
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	(O75643)	212	4
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6	(P62312)	53	1
Ubiquitin	(P62990)	469	10
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	(P68036)	64	1
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	(Q9JLA3)	75	2
UPF0385 protein C1orf82 homolog	(Q5I0E6)	140	2
Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	(Q29048)	255	6
Valyl-tRNA synthetase	(Q97ZK9)	922	17
Vesicle-fusing ATPase	(P18708)	82	2
Villin-1	(Q62468)	64	1
Vitellogenin-2 precursor (Vitellogenin II)	(Q98893)	47	2
WD repeat protein 23	(Q5E9I8)	190	4
Zinc finger and BTB domain-containing protein 37	(Q5TC79)	66	2

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Untersuchungen zur affinitäts-basierten Aufreinigung von *tight junction*-Proteinen und deren potentiellen Interaktionspartnern“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt, und ich besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Die Inhalte der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Berlin, November 2008

Dörte Lohrberg

Danksagung

An erster Stelle danke ich Dr. Ingolf E. Blasig für die Bereitstellung des Promotionsthemas und für die stetigen wissenschaftlichen Anregungen.

Dr. Reiner F. Haseloff danke ich für die umfassend fachliche sowie vertrauensvolle Betreuung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jörg Piontek und Dr. Lars Winkler für die hilfreichen Diskussionen, Tipps und konstruktiven Anregungen.

Ich bedanke mich bei meinen langjährigen Mitstreitern im Labor und Büro, Juliane Walter, Christian Piehl und Sandra Bittmann, für die angenehme Arbeitsatmosphäre.
Bei Barbara Eilemann bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur.

Ich danke auch der AG Massenspektrometrie für die ergebnisorientierte und freundliche Zusammenarbeit.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meiner Familie und meinen Freunden, die mich geduldig während der gesamten Zeit unterstützt und mir viel Kraft gegeben haben.